



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116585492 A

(43) 申请公布日 2023. 08. 15

(21) 申请号 202211533202.3

A61K 31/7088 (2006.01)

(22) 申请日 2015.09.16

A61P 27/06 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/864 (2006.01)

62/051,299 2014.09.16 US

C07K 14/015 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201580061882.5 2015.09.16

(71) 申请人 建新公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 P·佩汉 A·斯卡利亚

J·阿丁格

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

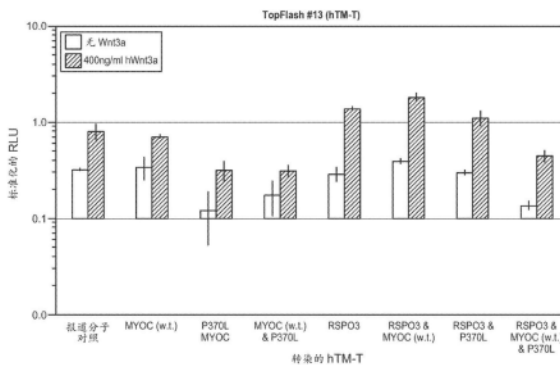
权利要求书1页 说明书59页
序列表(电子公布) 附图16页

(54) 发明名称

用于治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的腺伴随病毒载体

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的腺伴随病毒载体,并提供使用腺伴随病毒(AAV)载体用于治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的方法。一些方面,AAV载体编码R-脊椎蛋白1(RSP01)、R-脊椎蛋白2(RSP02)、R-脊椎蛋白3(RSP03)或R-脊椎蛋白4(RSP04)和/或靶向肌纤蛋白(MYOC)的RNAi。一方面,将病毒颗粒施用至人受试者的眼部。编码RSP01、RSP02、RSP03和/或RSP04和/或MYOC RNAi的病毒颗粒也考虑在内。一些方面,提供了转导小梁网的变体AAV2颗粒。



1. 一种用于治疗哺乳动物中肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的方法, 包括对所述哺乳动物的眼施用在所述哺乳动物的眼中增加Wnt信号传导的作用剂。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述作用剂在所述哺乳动物的眼的小梁网 (TM) 细胞中增加Wnt信号传导。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述作用剂增加所述哺乳动物眼的TM中的R-脊椎蛋白1 (RSP01)。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述作用剂增加所述哺乳动物眼的TM中的R-脊椎蛋白2 (RSP02)。

5. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述作用剂增加所述哺乳动物眼的TM中的R-脊椎蛋白4 (RSP04)。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法, 其中所述方法进一步包括在所述哺乳动物的眼中施用增加Wnt信号传导的第二作用剂。

7. 一种用于治疗哺乳动物中肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的方法, 包括对所述哺乳动物的眼施用重组腺伴随病毒 (rAAV) 颗粒, 所述颗粒包含编码RSP01、RSP02、RSP04或其功能性变体的载体。

8. 一种用于治疗哺乳动物中的肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的方法, 包括对所述哺乳动物的眼施用减少或抑制所述哺乳动物中肌纤蛋白 (MYOC) 的表达的作用剂。

9. 一种用于在具有眼部病症的哺乳动物中的小梁网细胞中增强Wnt信号传导的方法, 包括对所述哺乳动物的眼施用重组腺伴随病毒 (rAAV) 颗粒, 所述颗粒包含编码RSP01、RSP02、RSP04或其功能性变体的载体。

10. 一种包含AAV载体的重组AAV颗粒, 其中所述AAV载体包含编码RSP01、RSP02、RSP04或其功能性变体的核酸。

11. 一种包含AAV载体的重组AAV颗粒, 其中所述AAV载体包含编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白 (MYOC) 的表达的抑制性核酸的核酸。

12. 一种用于治疗哺乳动物中肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的试剂盒, 其包含含有编码RSP01、RSP02、RSP04或其功能性变体的载体的rAAV病毒颗粒。

13. 一种将核酸递送至哺乳动物的眼的小梁网的方法, 其包括将含有rAAV载体的AAV血清型2 (AAV2) 颗粒施用至所述哺乳动物的眼, 其中所述rAAV载体包含核酸, 且其中所述AAV2颗粒包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白, 所述氨基酸取代基于AAV2的VP1编号。

14. 一种治疗哺乳动物中眼部病症的方法, 其包括将含有rAAV载体的AAV2颗粒施用至所述哺乳动物的眼, 其中所述rAAV载体包含编码治疗性转基因的核酸, 且其中所述AAV2颗粒包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白, 所述氨基酸取代基于AAV2的VP1编号。

用于治疗肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的腺伴随病毒载体

[0001] 本发明申请是基于申请日为2015年09月16日,申请号为201580061882.5(国际申请号为PCT/US2015/050515)、名称为“用于治疗肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的腺伴随病毒载体”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 对相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2014年9月16日提交的美国临时申请号62/051,299的优先权,其在此处通过提述以其整体并入。

[0004] ASCII文本文件上的序列表的提交

[0005] 在ASCII文本文件上的下述提交内容通过提述以其整体并入:计算机可读形式(CRF)的序列列表(文件名:159792012540SeqList.txt,记录日期:2015年9月15日,大小:31KB)。

发明领域

[0006] 本发明涉及AAV载体和使用AAV载体用于治疗肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的方法。

[0007] 发明概述

[0008] 肌纤蛋白 (MYOC) 突变导致约2%-4%的原发性开角型青光眼 (POAG; ~90,000美国患者)。具体而言,青光眼MYOC突变P370L或Y437H导致10%-30%的幼年型POAG (JOAG; ~6,000美国患者)且与增加的眼内压 (IOP)、视网膜神经节细胞死亡和视神经头 (ONH) 损伤相关 (Shimizu等 (2000) *Am. J. Ophthalmol.* 130:165-77; Fan and Wiggs (2010) *J. Clin. Invest.* 120:3064-72)。

[0009] 尽管MYOC突变与青光眼相关,MYOC突变体对眼部功能的影响仍不清楚。因此,需要进一步理解MYOC和突变体MYOC的功能以揭示用于治疗肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的新型治疗性策略。

[0010] 本发明提供用于在哺乳动物中治疗肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的方法,包括对所述哺乳动物的眼部施用在所述哺乳动物的眼中增加Wnt信号传导的作用剂。在一些实施方案中,所述作用剂增加所述哺乳动物眼部的小梁网 (TM) 细胞中的Wnt信号传导。在一些实施方案中,所述作用剂增加所述哺乳动物眼中的R-脊椎蛋白1 (RSP01)、R-脊椎蛋白2 (RSP02)、R-脊椎蛋白3 (RSP03) 和/或R-脊椎蛋白4 (RSP04) 活性。在一些实施方案中,所述作用剂与在所述哺乳动物眼中增加一种或多种RSP0活性的一种或多种其他作用剂组合使用。在一些实施方案中,所述作用剂增加所述哺乳动物眼部TM中的RSP01。在一些实施方案中,所述作用剂是RSP01或其功能性变体。在一些实施方案中,所述作用剂是重组腺伴随病毒 (rAAV) 颗粒,其含有编码RSP01或其功能性变体的载体。在一些实施方案中,RSP01是截短的RSP01。在一些实施方案中,作用剂增加所述哺乳动物眼部TM中的RSP02。在一些实施方案中,所述作用剂是RSP02或其功能性变体。在一些实施方案中,所述作用剂是重组腺伴随病毒 (rAAV) 颗粒,其包含编码RSP02或其功能性变体的载体。在一些实施方案中,RSP02是截短的RSP02。在一些实施方案中,所述作用剂增加所述哺乳动物眼部TM中的RSP03。在一些实施方案中,所述作用剂是RSP03或其功能性变体。在一些实施方案中,所述作用剂是重组腺伴随病毒 (rAAV)

颗粒,其包含编码RSP03或其功能性变体的载体。在一些实施方案中,RSP03是截短的RSP03。在一些实施方案中,所述作用剂增加所述哺乳动物眼部TM中的RSP04。在一些实施方案中,所述作用剂是RSP04或其功能性变体。在一些实施方案中,所述作用剂是重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,其包含编码RSP04或其功能性变体的载体。在一些实施方案中,RSP04是截短的RSP04。

[0011] 一些方面,本发明提供在所述哺乳动物的眼中施用增加Wnt信号传导的第二作用剂。在一些实施方案中,所述第二作用剂增加所述哺乳动物眼部TM中的Wnt信号传导。在一些实施方案中,所述第二作用剂减少或抑制所述哺乳动物眼中肌纤蛋白(MYOC)的表达。在一些实施方案中,所述第二作用剂减少或抑制所述哺乳动物眼部TM中MYOC的表达。在一些实施方案中,所述第二作用剂是重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,其包含编码靶向MYOC的表达的抑制性核酸的载体。在一些实施方案中,抑制性核酸是靶向MYOC的表达的MYOC RNAi。在一些实施方案中,MYOC RNAi是靶向MYOC的表达的MYOC shRNA。

[0012] 一些方面,本发明的作用剂减少或抑制所述哺乳动物眼中肌纤蛋白(MYOC)的表达。在一些实施方案中,所述作用剂减少或抑制所述哺乳动物眼部TM中MYOC的表达。在一些实施方案中,所述作用剂是重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,其包含编码靶向MYOC的表达的抑制性核酸的载体。在一些实施方案中,抑制性核酸是靶向MYOC的表达的MYOC RNAi。在其他实施方案中,MYOC RNAi是靶向MYOC的表达的MYOC shRNA。

[0013] 在本发明的一些实施方案中,所述方法进一步包括在所述哺乳动物的眼中施用增加Wnt信号传导的第二作用剂。在一些实施方案中,所述第二作用剂增加所述哺乳动物眼部TM中的Wnt信号传导。在一些实施方案中,所述第二作用剂增加所述哺乳动物眼中R-脊椎蛋白1(RSP01)、R-脊椎蛋白2(RSP02)、R-脊椎蛋白3(RSP03)或R-脊椎蛋白4(RSP04)的活性。在一些实施方案中,所述第二作用剂增加所述哺乳动物眼部TM中的RSP01。在一些实施方案中,所述第二作用剂是RSP01或其功能性变体。在一些实施方案中,所述第二作用剂是重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,其包含编码RSP01或其功能性变体的载体。在一些实施方案中,RSP01是截短的RSP01。在一些实施方案中,所述第二作用剂增加所述哺乳动物眼部TM中的RSP02。在一些实施方案中,所述第二作用剂是RSP02或其功能性变体。在一些实施方案中,所述第二作用剂是重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,其包含编码RSP02或其功能性变体的载体。在一些实施方案中,RSP02是截短的RSP02。在一些实施方案中,所述第二作用剂增加所述哺乳动物眼部TM中的RSP03。在一些实施方案中,所述第二作用剂是RSP03或其功能性变体。在一些实施方案中,所述第二作用剂是重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,其包含编码RSP03或其功能性变体的载体。在一些实施方案中,RSP03是截短的RSP03。在一些实施方案中,所述第二作用剂增加所述哺乳动物眼部TM中的RSP04。在一些实施方案中,所述第二作用剂是RSP04或其功能性变体。在一些实施方案中,所述第二作用剂是重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,其包含编码RSP04或其功能性变体的载体。在一些实施方案中,RSP04是截短的RSP04。

[0014] 一些方面,本发明提供用于在哺乳动物中治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的方法,包括对所述哺乳动物的眼部施用重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,所述颗粒包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的载体。一些方面,本发明提供在哺乳动物中用于治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的方法,包括对所述哺乳动物眼部施用重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,所述颗粒包含编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白(MYOC)的表达的MYOC RNAi的载体。其

他方面,本发明提供在哺乳动物中用于治疗肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的方法,包括对所述哺乳动物的眼部施用增加所述哺乳动物眼中Wnt信号传导的作用剂和减少或抑制所述哺乳动物中肌纤蛋白的表达的作用剂。其他方面,本发明提供在哺乳动物中用于治疗肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的方法,包括对所述哺乳动物的眼部施用包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的载体的重组腺伴随病毒 (rAAV) 颗粒和包含编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白的表达的MYOC RNAi的载体的rAAV颗粒。另一方面,本发明提供在哺乳动物中用于治疗肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的方法,包括对所述哺乳动物的眼部施用重组腺伴随病毒 (rAAV) 颗粒,所述颗粒包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体和编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白的表达的MYOC shRNA (MYOC shRNA) 的载体。在一些实施方案中, RNAi是靶向MYOC的shRNA。在一些实施方案中,shRNA减少或抑制MYOC的表达。

[0015] 一些方面,本发明提供用于在具有眼部病症的哺乳动物的小梁网细胞中增强Wnt信号传导的方法,包括对所述哺乳动物的眼部施用重组腺伴随病毒 (rAAV) 颗粒,所述颗粒包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的载体。一些方面,本发明提供用于在具有眼部病症的哺乳动物小梁网细胞中增强Wnt信号传导的方法,包括对所述哺乳动物的眼部施用重组腺伴随病毒 (rAAV) 颗粒,所述颗粒包含编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白 (MYOC) 的表达的抑制性核酸的载体。其他方面,本发明提供用于在具有眼部病症的哺乳动物的小梁网细胞中增强Wnt信号传导的方法,包括对所述哺乳动物的眼部施用重组腺伴随病毒 (rAAV) 颗粒,所述颗粒包含编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白 (MYOC) 的表达的MYOC RNAi的载体。其他方面,本发明提供用于在具有眼部病症的哺乳动物的小梁网细胞中增强Wnt信号传导的方法,包括对所述哺乳动物的眼部施用包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的载体的重组腺伴随病毒 (rAAV) 颗粒和包含编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白的表达的MYOC RNAi的载体的rAAV颗粒。其他方面,本发明提供用于在具有眼部病症的哺乳动物中增强小梁网细胞中的Wnt信号传导的方法,包括对所述哺乳动物的眼部施用重组腺伴随病毒 (rAAV) 颗粒,所述颗粒包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体和编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白的表达的MYOC RNAi的载体。在一些实施方案中,所述眼部病症是肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼。

[0016] 在一些实施方案中,所述哺乳动物是人。在本发明的一些实施方案中,肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼与肌纤蛋白中的突变相关。在一些实施方案中,肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼与人肌纤蛋白中的突变相关。在一些实施方案中,肌纤蛋白突变包含选自以下的一个或多个氨基酸取代:E323K、K398R、Q368X、G364V、P370L、D380A、K423E、Y437H和I477S。在一些实施方案中,肌纤蛋白突变包含P370L氨基酸取代。在一些实施方案中,肌纤蛋白突变包含Y437H氨基酸取代。在一些实施方案中,肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼是原发性开角型青光眼 (POAC)。在一些实施方案中,肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼是幼年型原发性开角型青光眼 (JOAC)。在本发明的一些实施方案中,治疗减少肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的症状。在一些实施方案中,减少肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的症状是减少眼内压、减少小梁网中MYOC的积累、减少眼高压或增加来自小梁网的房水外流。

[0017] 在一些实施方案中,RSP01是人RSP01。在一些实施方案中,RSP01与人RSP01具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP01包含SEQ IDNO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,RSP01与SEQ ID

NO:8具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP01包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。在一些实施方案中,RSP01与SEQ ID NO:11具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP01包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一些实施方案中,RSP01与SEQ ID NO:12具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP02是人RSP02。在一些实施方案中,RSP02与人RSP02具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP02包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一些实施方案中,RSP02与SEQ ID NO:9具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP02包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。在一些实施方案中,RSP02与SEQ IDNO:13具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP02包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在一些实施方案中,RSP02与SEQ ID NO:14具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP03是人RSP03。在一些实施方案中,RSP03与人RSP03具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP03包含SEQ IDNO:1的氨基酸序列。在一些实施方案中,RSP03与SEQ ID NO:1具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP03包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在一些实施方案中,RSP03与SEQ ID NO:15具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP03包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,RSP03包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,RSP03与SEQ ID NO:17具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP04是人RSP04。在一些实施方案中,RSP04与人RSP04具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP04包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施方案中,RSP04与SEQ ID NO:10具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP04包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在一些实施方案中,RSP04与SEQ ID NO:18具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP04包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,RSP04与SEQ ID NO:12具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP01、RSP02、RSP03、RSP04和/或其功能性变体与启动子可操作地连接。在一些实施方案中,启动子能够在所述哺乳动物的眼中表达RSP01、RSP02、RSP03、RSP04和/或其功能性变体。在一些实施方案中,启动子能够在小梁网的细胞中表达RSP01、RSP02、RSP03、RSP04和/或其功能性变体。在一些实施方案中,启动子是杂交鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子。

[0018] 在一些实施方案中,本发明靶向MYOC的表达的MYOC RNAi靶向人MYOC。在一些实施方案中,RNAi是小抑制性RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)或小发夹RNA(shRNA)。在一些实施方案中,MYOC RNAi是MYOC shRNA。在一些实施方案中,shRNA靶向SEQ ID NO:6所示的MYOC的

氨基酸序列。在一些实施方案中,shRNA包含SEQ ID NO:7的环序列。在一些实施方案中,MYOC RNAi (例如shRNA)与启动子可操作连接。在一些实施方案中,启动子能够在所述哺乳动物的眼中表达MYOC RNAi (例如shRNA)。在另一实施方案中,启动子能够在小梁网的细胞中表达MYOC RNAi (例如shRNA)。在一些实施方案中,启动子是杂交鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子。在一些实施方案中,启动子是RNA聚合酶III启动子。在一些实施方案中,MYOC RNAi (例如shRNA)的表达减少或抑制所述哺乳动物眼中MYOC的表达。在一些实施方案中,MYOC RNAi (例如shRNA)的表达减少或抑制所述哺乳动物小梁网的细胞中MYOC的表达。在一些实施方案中,MYOC是野生型MYOC。在一些实施方案中,MYOC是突变体MYOC。在一些实施方案中,MYOC是野生型MYOC和突变体MYOC。在另一个实施方案中,突变体MYOC包含对应人MYOC的P370L和/或Y437H氨基酸取代的氨基酸取代。在一些实施方案中,肌纤蛋白突变包含选自以下的一个或多个氨基酸取代:E323K、K398R、Q368X、G364V、P370L、D380A、K423E、Y437H和I477S。

[0019] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,AAV病毒颗粒包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6 (例如野生型AAV6衣壳或变体AAV6衣壳如ShH10,如U.S.PG Pub.2012/0164106中所述)、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9 (例如野生型AAV9衣壳或修饰的AAV9衣壳,如U.S.PG Pub.2013/0323226中所述)、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、酪氨酸衣壳突变体、发夹结合衣壳突变体、AAV2R471A衣壳、AAVAAV2/2-7m8衣壳、AAV DJ衣壳 (例如AAV-DJ/8衣壳、AAV-DJ/9衣壳或U.S.PG Pub.2012/0066783中所述的任何其他衣壳)、AAV2 N587A衣壳、AAV2 E548A衣壳、AAV2 N708A衣壳、AAV V708K衣壳、山羊AAV衣壳、AAV1/AAV2嵌合衣壳、牛AAV衣壳、小鼠AAV衣壳、rAAV2/HBoV1衣壳或美国专利号8,283,151或国际公开号WO/2003/042397中所述的AAV衣壳。在一些实施方案中,AAV病毒颗粒包含在R484、R487、K527、K532、R585或R588的一个或多个位置含有氨基酸取代的AAV衣壳,其基于AAV2的VP1编号。在其他实施方案中,AAV颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型的衣壳蛋白。在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒包含AAV血清型2衣壳。在其他实施方案中,AAV血清型2衣壳包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其相对AAV2 VP1编号。在一些实施方案中,载体包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型反向末端重复(ITR)。在一些实施方案中,载体包括AAV血清型2ITR。在一些实施方案中,AAV病毒颗粒包含源自相同AAV血清型的一个或多个ITR和衣壳。在其他实施方案中,AAV病毒颗粒包含源自与rAAV病毒颗粒的衣壳不同AAV血清型的一个或多个ITR。在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒包含AAV2衣壳,且其中所述载体包含AAV2 ITR。在其他实施方案中,AAV2衣壳包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其相对AAV2 VP1编号。

[0020] 在一些实施方案中,将至少 1×10^9 基因组拷贝的rAAV颗粒施用至哺乳动物。在一些实施方案中,将AAV施用至所述哺乳动物眼部的角膜、视网膜和/或巩膜。在一些实施方案中,AAV颗粒通过玻璃体内注射和/或房内注射施用。在一些实施方案中,将rAAV施用至眼部多于一处的位置。

[0021] 在一些实施方案中,本发明提供在哺乳动物中治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的方法,其中所述哺乳动物是人。在一些实施方案中,肌纤蛋白(MYOC)青光眼是原发性开角型青光眼(POAC)。在一些实施方案中,肌纤蛋白(MYOC)青光眼是幼年型原发性开角型青光眼(JOAC)。

[0022] 在本发明的一些实施方案中，rAAV病毒颗粒在药物组合中。在其他实施方案中，所述药物组合进一步包含药物上可接受的载剂。

[0023] 在上述方法的一些实施方案中，所述作用剂（例如AAV颗粒）与增加R-脊椎蛋白（例如RSP01、RSP02、RSP03和/或RSP04）活性的一种或多种其他作用剂组合使用。

[0024] 一些方面，本发明提供含有AAV载体的重组AAV颗粒，其中所述AAV载体包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的核酸。其他方面，本发明提供rAAV颗粒，其含有编码靶向哺乳动物中肌纤蛋白（MYOC）表达的抑制性核酸的载体。其他方面，本发明提供rAAV颗粒，其包含编码靶向哺乳动物中肌纤蛋白（MYOC）表达的MYOC RNAi的载体。其他方面，本发明提供rAAV颗粒，其包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体和编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白的表达的MYOC RNAi的载体。

[0025] 在一些实施方案中，AAV载体包含编码RSP01或其功能性变体的核酸，且所述RSP01或其功能性变体是人RSP01。在一些实施方案中，AAV载体包含编码RSP01或其功能性变体的核酸，且所述RSP01或其功能性变体包含SEQ ID NO:8、11和/或12的氨基酸序列。在一些实施方案中，AAV载体包含编码RSP01或其功能性变体的核酸，且所述RSP01或其功能性变体包含与SEQ ID NO:8、11和/或12的氨基酸序列具有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，AAV载体包含编码RSP02或其功能性变体的核酸，且所述RSP02或其功能性变体是人RSP02。在一些实施方案中，AAV载体包含编码RSP02或其功能性变体的核酸，且所述RSP02或其功能性变体包含SEQ ID NO:9、13和/或14的氨基酸序列。在一些实施方案中，AAV载体包含编码RSP02或其功能性变体的核酸，且所述RSP02或其功能性变体包含与SEQ ID NO:9、13和/或14的氨基酸序列具有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，AAV载体包含编码RSP03或其功能性变体的核酸，且所述RSP03或其功能性变体是人RSP03。在一些实施方案中，AAV载体包含编码RSP03或其功能性变体的核酸，且所述RSP03或其功能性变体包含SEQ ID NO:1和/或15-17的氨基酸序列。在一些实施方案中，AAV载体包含编码RSP03或其功能性变体的核酸，且所述RSP03或其功能性变体包含与SEQ ID NO:1和/或15-17的氨基酸序列具有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，AAV载体包含编码RSP04的核酸，且所述RSP04是人RSP04。在一些实施方案中，AAV载体包含编码RSP04或其功能性变体的核酸，且所述RSP04或其功能性变体包含SEQ IDNO:10、18和/或19的氨基酸序列。在一些实施方案中，AAV载体包含编码RSP04或其功能性变体的核酸，且所述RSP04或其功能性变体包含与SEQ IDNO:10、18和/或19的氨基酸序列具有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在其他实施方案中，RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体与启动子可操作连接。在其他实施方案中，启动子能够在所述哺乳动物的眼中表达RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体。在一些实施方案中，所述启动子能够在小梁网的细胞中表达RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体。在一些实施方案中，启动子是杂交鸡 β -肌动蛋白（CBA）启动子。

[0026] 在一些实施方案中，靶向哺乳动物中的肌纤蛋白（MYOC）表达的抑制性核酸是RNAi。在一些实施方案中，本发明靶向MYOC的表达的MYOC RNAi（例如shRNA）靶向人MYOC。在一些实施方案中，RNAi是小抑制性RNA（siRNA）、微小RNA（miRNA）或小发夹RNA（shRNA）。在一

些实施方案中,MYOC RNAi是shRNA。在一些实施方案中,RNAi(例如shRNA)靶向SEQ IDNO:6中所示的MYOC的氨基酸序列。在一些实施方案中,RNAi(例如shRNA)包含SEQ ID NO:7的环序列。在一些实施方案中,MYOC RNAi(例如shRNA)与启动子可操作连接。在一些实施方案中,启动子能够在所述哺乳动物眼中表达MYOC RNAi(例如shRNA)。在其他实施方案中,启动子能够在小梁网的细胞中表达MYOC RNAi(例如shRNA)。在一些实施方案中,启动子是杂交鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子。在一些实施方案中,启动子是RNA聚合酶III启动子。在一些实施方案中,MYOC RNAi(例如shRNA)的表达减少或抑制所述哺乳动物眼中MYOC的表达。在一些实施方案中,MYOC RNAi(例如shRNA)的表达减少或抑制哺乳动物的小梁网的细胞中MYOC的表达。在一些实施方案中,MYOC是野生型MYOC。在一些实施方案中,MYOC是突变体MYOC。在一些实施方案中,MYOC是野生型MYOC和突变体MYOC。在其他实施方案中,突变体MYOC包含对应人MYOC的E323K、K398R、Q368X、G364V、P370L、D380A、K423E、Y437H和I477S氨基酸取代的氨基酸取代。在一些实施方案中,突变体MYOC包含对应人MYOC的P370L和/或Y437H氨基酸取代的氨基酸取代。在一些实施方案中,肌纤蛋白突变与原发性开角型青光眼(POAC)相关。在一些实施方案中,肌纤蛋白突变与幼年型原发性开角型青光眼(JOAC)相关。

[0027] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,AAV病毒颗粒包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6(例如野生型AAV6衣壳或变体AAV6衣壳如ShH10,如U.S.PG Pub.2012/0164106中所述)、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9(例如野生型AAV9衣壳或修饰的AAV9衣壳,如U.S.PG Pub.2013/0323226中所述)、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、酪氨酸衣壳突变体、发夹结合衣壳突变体、AAV2R471A衣壳、AAVA2/2-7m8衣壳、AAV DJ衣壳(例如AAV-DJ/8衣壳、AAV-DJ/9衣壳或U.S.PG Pub.2012/0066783中所述的任何其他衣壳)、AAV2 N587A衣壳、AAV2 E548A衣壳、AAV2 N708A衣壳、AAV V708K衣壳、山羊AAV衣壳、AAV1/AAV2嵌合衣壳、牛AAV衣壳、小鼠AAV衣壳、rAAV2/HBoV1衣壳或美国专利号8,283,151或国际公开号WO/2003/042397中所述的AAV衣壳。在一些实施方案中,AAV病毒颗粒包含在R484、R487、K527、K532、R585或R588的一个或多个位置含有氨基酸取代的AAV衣壳,其基于AAV2的VP1编号。在其他实施方案中,AAV颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型的衣壳蛋白。在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒包含AAV血清型2衣壳。在其他实施方案中,AAV血清型2衣壳包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其相对AAV2 VP1编号。在一些实施方案中,所述载体包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型反向末端重复(ITR)。在一些实施方案中,载体包含AAV血清型2ITR。在一些实施方案中,AAV病毒颗粒包含源自相同AAV血清型的一个或多个ITR和衣壳。在其他实施方案中,AAV病毒颗粒包含源自与rAAV病毒颗粒的衣壳不同AAV血清型的一个或多个ITR。在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒包含AAV2衣壳,且其中所述载体包含AAV2 ITR。在其他实施方案中,AAV2衣壳包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其相对AAV2 VP1编号。

[0028] 本发明提供含有任何本文所述的重组AAV颗粒的药物组合物。本发明还提供适用于任何本文所述的方法的药物组合物。本发明提供本文所述的药物组合物和重组AAV颗粒在制造用于在哺乳动物中治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的药物中的用途。在一些实施方案中,所述哺乳动物是人。在一些实施方案中,肌纤蛋白(MYOC)青光眼是原发性开角型青光眼(POAC)。在一些实施方案中,肌纤蛋白(MYOC)青光眼是幼年型原发性开角型青光眼(JOAC)。

[0029] 一些方面,本发明提供用于在哺乳动物中治疗肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的试剂盒,其中所述试剂盒包含含有编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的载体的rAAV病毒颗粒;含有AAV载体的rAAV病毒颗粒,其中所述AAV载体包含编码靶向哺乳动物中肌纤蛋白 (MYOC) 表达的抑制性核酸(例如,包含MYOC RNAi的shRNA)的核酸;和/或包含AAV载体的rAAV病毒颗粒,其中所述AAV载体包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体和编码靶向哺乳动物中MYOC的表达的MYOC RNAi(例如shRNA)的核酸。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含用于在治疗肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼中使用的说明。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含缓冲液和/或药物上可接受的赋形剂。

[0030] 在一些实施方案中,本发明的试剂盒包含编码靶向哺乳动物中MYOC表达的MYOC RNAi(例如shRNA)的核酸。在一些实施方案中,MYOC RNAi靶向人MYOC的表达。在一些实施方案中,MYOC RNAi靶向SEQ ID NO:6所示的MYOC的氨基酸序列。在一些实施方案中,RNAi是小抑制性RNA (siRNA)、微小RNA (miRNA) 或小发夹RNA (shRNA)。在一些实施方案中,RNAi是shRNA。在一些实施方案中,MYOC shRNA包含SEQ ID NO:7的环序列。在一些实施方案中,本发明的试剂盒包含AAV载体,其中所述AAV载体包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的核酸。在一些实施方案中,AAV载体包含编码RSP01或其功能性变体的核酸,且RSP01或其功能性变体是人RSP01。在一些实施方案中,AAV载体包含编码RSP01或其功能性变体的核酸,且RSP01或其功能性变体包含SEQ ID NO:8、11和/或12的氨基酸序列。在一些实施方案中,AAV载体包含编码RSP01或其功能性变体的核酸,且RSP01或其功能性变体包含与SEQ ID NO:8、11和/或12的氨基酸序列具有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,AAV载体包含编码RSP02或其功能性变体的核酸,且RSP02或其功能性变体是人RSP02。在一些实施方案中,AAV载体包含编码RSP02或其功能性变体的核酸,且RSP02或其功能性变体包含SEQ ID NO:9、13和/或14的氨基酸序列。在一些实施方案中,AAV载体包含编码RSP02或其功能性变体的核酸,且RSP02或其功能性变体包含与SEQ ID NO:9、13和/或14的氨基酸序列具有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,AAV载体包含编码RSP03或其功能性变体的核酸,且RSP03或其功能性变体是人RSP03。在一些实施方案中,AAV载体包含编码RSP03或其功能性变体的核酸,且RSP03或其功能性变体包含SEQ ID NO:1和/或15-17的氨基酸序列。在一些实施方案中,AAV载体包含编码RSP03或其功能性变体的核酸,且RSP03或其功能性变体包含与SEQ ID NO:1和/或15-17的氨基酸序列具有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,AAV载体包含编码RSP04或其功能性变体的核酸,且RSP04或其功能性变体是人RSP04。在一些实施方案中,AAV载体包含编码RSP04或其功能性变体的核酸,且RSP04或其功能性变体包含SEQ ID NO:10、18和/或19的氨基酸序列。在一些实施方案中,AAV载体包含编码RSP04或其功能性变体的核酸,且RSP04或其功能性变体包含与SEQ ID NO:10、18和/或19的氨基酸序列具有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体与启动子可操作连接。在一些实施方案中,启动子能够在哺乳动物的眼中表达RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体。在一些实施方案中,启动子能够在小梁网的细胞中表达RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体。在一些实施方案中,启动子

是杂交鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子。在一些实施方案中,MYOC RNAi与启动子可操作连接。在一些实施方案中,启动子能够在哺乳动物的眼中表达MYOC RNAi。在一些实施方案中,启动子能够在小梁网的细胞中表达MYOC RNAi。在一些实施方案中,启动子是杂交鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子。在一些实施方案中,启动子是RNA聚合酶III启动子。在一些实施方案中,MYOC RNAi的表达减少或抑制哺乳动物眼中MYOC的表达。在一些实施方案中,MYOC RNAi的表达减少或抑制哺乳动物小梁网的细胞中MYOC的表达。

[0031] 在一些实施方案中,本文所述的AAV颗粒可与增加R-脊椎蛋白(例如RSP01、RSP02、RSP03和/或RSP04)活性的一种或多种其他作用剂组合使用。

[0032] 在一些实施方案中,本发明的试剂盒包含AAV病毒颗粒,所述颗粒含有载体和AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6(例如野生型AAV6衣壳或变体AAV6衣壳如ShH10,如U.S.PG Pub.2012/0164106中所述)、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9(例如野生型AAV9衣壳或修饰的AAV9衣壳,如U.S.PG Pub.2013/0323226中所述)、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、酪氨酸衣壳突变体、发夹结合衣壳突变体、AAV2R471A衣壳、AAVA2/2-7m8衣壳、AAVDJ衣壳(例如AAV-DJ/8衣壳、AAV-DJ/9衣壳或U.S.PG Pub.2012/0066783中所述的任何其他衣壳)、AAV2 N587A衣壳、AAV2 E548A衣壳、AAV2 N708A衣壳、AAV V708K衣壳、山羊AAV衣壳、AAV1/AAV2嵌合衣壳、牛AAV衣壳、小鼠AAV衣壳、rAAV2/HBoV1衣壳或美国专利号8,283,151或国际公开号W0/2003/042397中所述的AAV衣壳。在一些实施方案中,AAV病毒颗粒包含AAV衣壳,所述衣壳在位置R484、R487、K527、K532、R585或R588的一处或多处含有氨基酸取代,其基于AAV2的VP1编号。在其他实施方案中,AAV颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型的衣壳蛋白。在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒包含AAV血清型2衣壳。在一些实施方案中,AAV血清型2衣壳包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其相对AAV2 VP1编号。在一些实施方案中,载体包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAVDJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型反向末端重复(ITR)。在一些实施方案中,载体包含AAV血清型2ITR。在一些实施方案中,AAV病毒颗粒包含源自相同AAV血清型的一个或多个ITR和衣壳。在一些实施方案中,AAV病毒颗粒包含源自与rAAV病毒颗粒的衣壳不同AAV血清型的一个或多个ITR。在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒包含AAV2衣壳,且载体包含AAV2 ITR。在一些实施方案中,AAV2衣壳包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其相对AAV2 VP1编号。

[0033] 在上述试剂盒的一些实施方案中,所述试剂盒的AAV颗粒与增加R-脊椎蛋白(例如RSP01、RSP02、RSP03和/或RSP04)活性的一种或多种其他作用剂组合使用。在一些实施方案中,本发明的试剂盒包含如本文所述的AAV颗粒和增加R-脊椎蛋白(例如RSP01、RSP02、RSP03和/或RSP04)的活性的一种或多种其他作用剂。

[0034] 本发明提供适于在本文所述任何一种方法中使用的试剂盒。本发明提供包含本文所述的任何重组AAV颗粒的试剂盒。一些方面,本文所述的试剂盒进一步包括用于在治疗肌纤维蛋白(MYOC)青光眼中使用的说明。一些方面,本文所述的试剂盒进一步包含缓冲液和/或药物上可接受的赋形剂。

[0035] 一些方面,本发明提供向哺乳动物眼部小梁网递送核酸(例如编码治疗性转基因的核酸)的方法,包括向所述哺乳动物的眼部施用含有rAAV载体的AAV血清型2(AAV2)颗粒,其中所述rAAV载体包含核酸,且其中AAV2颗粒包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,

其基于AAV2的VP1编号。一些方面,本发明提供治疗哺乳动物中的眼部病症的方法,其包括对所述哺乳动物的眼部施用包含rAAV载体的AAV2颗粒,其中所述rAAV载体包含编码治疗性转基因的核酸,且其中所述AAV2颗粒包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其基于AAV2的VP1编号。在一些实施方案中,玻璃体内和/或房内施用rAAV颗粒。在一些实施方案中,rAAV颗粒转导眼部的小梁网的细胞。在一些实施方案中,治疗性转基因在眼部的小梁网中表达。在一些实施方案中,治疗性转基因编码治疗性多肽或治疗性核酸。在一些实施方案中,眼部病症是与眼部的小梁网相关的病症。在一些实施方案中,眼部病症是肌纤蛋白(MYOC)青光眼。在一些实施方案中,哺乳动物是人。

[0036] 一些方面,本发明提供用于将核酸(例如编码治疗性转基因的核酸)递送至哺乳动物眼部小梁网的重组AAV2颗粒,其中所述AAV2颗粒包含rAAV载体,其中所述rAAV载体包含核酸,且其中AAV2颗粒包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其基于AAV2的VP1编号。一些方面,本发明提供用于治疗哺乳动物中眼部病症的重组AAV2颗粒,其中所述AAV2颗粒包含rAAV载体,其中rAAV载体包含编码治疗性转基因的核酸,且其中所述AAV2颗粒包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其基于AAV2的VP1编号。在一些实施方案中,rAAV颗粒转导眼部的小梁网的细胞。在一些实施方案中,治疗性转基因在眼部小梁网中表达。在一些实施方案中,治疗性转基因编码治疗性多肽或治疗性核酸。在一些实施方案中,所述眼部病症是与眼部的小梁网相关的病症。在一些实施方案中,眼部病症是肌纤蛋白(MYOC)青光眼。在一些实施方案中,所述哺乳动物是人。

[0037] 一些方面,本发明提供重组AAV2颗粒用于将核酸(例如编码治疗性转基因的核酸)递送至哺乳动物眼部的小梁网的用途,其中所述AAV2颗粒包含rAAV载体,其中所述rAAV载体包含所述核酸,且其中所述AAV2颗粒包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其基于AAV2的VP1编号。一些方面,本发明提供重组AAV2颗粒用于在哺乳动物中治疗眼部病症的用途,其中所述AAV2颗粒包含rAAV载体,其中所述rAAV载体包含编码治疗性转基因的核酸,且其中所述AAV2颗粒包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其基于AAV2的VP1编号。在一些实施方案中,玻璃体内和/或房内施用rAAV颗粒。在一些实施方案中,rAAV颗粒转导眼部的小梁网的细胞。在一些实施方案中,治疗性转基因在眼部小梁网中表达。在一些实施方案中,治疗性转基因编码治疗性多肽或治疗性核酸。在一些实施方案中,所述眼部病症是与眼部小梁网相关的病症。在一些实施方案中,所述眼部病症是肌纤蛋白(MYOC)青光眼。在一些实施方案中,所述哺乳动物是人。

[0038] 一些方面,本发明提供将核酸(例如编码治疗性转基因的核酸)递送至哺乳动物眼部小梁网的试剂盒,其包含含有rAAV载体的rAAV2颗粒,其中所述rAAV载体包含所述核酸,且其中所述AAV2颗粒包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其基于AAV2的VP1编号。一些方面,本发明提供用于治疗哺乳动物中眼部病症的试剂盒,其包含含有rAAV载体的rAAV2颗粒,其中所述rAAV载体包含编码治疗性转基因的核酸,且其中所述AAV2颗粒包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其基于AAV2的VP1编号。在一些实施方案中,玻璃体内和/或房内施用rAAV颗粒。在一些实施方案中,rAAV颗粒转导眼部的小梁网的细胞。在一些实施方案中,治疗性转基因在眼部小梁网中表达。在一些实施方案中,治疗性转基因编码治疗性多肽或治疗性核酸。在一些实施方案中,所述眼部病症是与眼部小梁网相关的病症。在一些实施方案中,眼部病症是肌纤蛋白(MYOC)青光眼。在一些实施方案中,哺乳动物是人。

- [0039] 本文引用的全部参考文献包括专利申请和出版物通过提述以其整体并入。
- [0040] 具体地,本发明涉及如下各项:
- [0041] 1.用于治疗哺乳动物中肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的方法,包括对所述哺乳动物的眼施用在所述哺乳动物的眼中增加Wnt信号传导的作用剂。
- [0042] 2.项1的方法,其中所述作用剂在所述哺乳动物的眼的小梁网(TM)细胞中增加Wnt信号传导。
- [0043] 3.项1或2的方法,其中所述作用剂增加所述哺乳动物眼中R-脊椎蛋白1(RSP01)、R-脊椎蛋白2(RSP02)、R-脊椎蛋白3(RSP03)或R-脊椎蛋白4(RSP04)的活性。
- [0044] 4.项3的方法,其中所述作用剂增加所述哺乳动物眼的TM中的RSP01。
- [0045] 5.项4的方法,其中所述作用剂是RSP01或其功能性变体。
- [0046] 6.项4的方法,其中所述作用剂是重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,所述颗粒包含编码RSP01或其功能性变体的载体。
- [0047] 7.项6的方法,其中所述RSP01是截短的RSP01。
- [0048] 8.项3的方法,其中所述作用剂增加所述哺乳动物眼的TM中的RSP02。
- [0049] 9.项8的方法,其中所述作用剂是RSP02或其功能性变体。
- [0050] 10.项8的方法,其中所述作用剂是重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,所述颗粒包含编码RSP02或其功能性变体的载体。
- [0051] 11.项10的方法,其中所述RSP02是截短的RSP02。
- [0052] 12.项3的方法,其中所述作用剂增加所述哺乳动物眼的TM中的RSP03。
- [0053] 13.项12的方法,其中所述作用剂是RSP03或其功能性变体。
- [0054] 14.项12的方法,其中所述作用剂是重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,所述颗粒包含编码RSP03或其功能性变体的载体。
- [0055] 15.项14的方法,其中所述RSP03是截短的RSP03。
- [0056] 16.项3的方法,其中所述作用剂在所述哺乳动物眼的TM中增加RSP04。
- [0057] 17.项16的方法,其中所述作用剂是RSP04或其功能性变体。
- [0058] 18.项16的方法,其中所述作用剂是重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,所述颗粒包含编码RSP04或其功能性变体的载体。
- [0059] 19.项18的方法,其中所述RSP04是截短的RSP04。
- [0060] 20.项3-19任一项的方法,其中所述方法进一步包括在所述哺乳动物的眼中施用增加Wnt信号传导的第二作用剂。
- [0061] 21.项20的方法,其中所述第二作用剂增加所述哺乳动物眼的TM中的Wnt信号传导。
- [0062] 22.项20或21的方法,其中所述第二作用剂减少或抑制所述哺乳动物眼中肌纤蛋白(MYOC)的表达。
- [0063] 23.项22的方法,其中所述第二作用剂减少或抑制所述哺乳动物眼的TM中MYOC的表达。
- [0064] 24.项22或23的方法,其中所述第二作用剂是重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,所述颗粒包含编码靶向MYOC的表达的抑制性核酸的载体。
- [0065] 25.项24的方法,其中所述抑制性核酸是靶向MYOC的表达的MYOC RNAi。

- [0066] 26. 项25的方法,其中所述MYOC RNAi是靶向MYOC的表达的MYOC shRNA。
- [0067] 27. 项1或2的方法,其中所述作用剂减少或抑制所述哺乳动物眼中肌纤蛋白(MYOC)的表达。
- [0068] 28. 项27的方法,其中所述作用剂减少或抑制所述哺乳动物眼的TM中MYOC的表达。
- [0069] 29. 项28的方法,其中所述作用剂是重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,所述颗粒包含编码靶向MYOC的表达的抑制性核酸的载体。
- [0070] 30. 项29的方法,其中所述抑制性核酸是靶向MYOC的表达的MYOC RNAi。
- [0071] 31. 项30的方法,其中所述MYOC RNAi是靶向MYOC的表达的MYOC shRNA。
- [0072] 32. 项27-31任一项的方法,其中所述方法进一步包括在所述哺乳动物眼中施用增加Wnt信号传导的第二作用剂。
- [0073] 33. 项32的方法,其中所述第二作用剂增加所述哺乳动物眼的TM中的Wnt信号传导。
- [0074] 34. 项32或33的方法,其中所述第二作用剂增加所述哺乳动物眼中R-脊椎蛋白1(RSP01)、R-脊椎蛋白2(RSP02)、R-脊椎蛋白3(RSP03)或R-脊椎蛋白4(RSP04)的活性。
- [0075] 35. 项34的方法,其中所述第二作用剂增加所述哺乳动物眼的TM中的RSP01。
- [0076] 36. 项35的方法,其中所述第二作用剂是RSP01或其功能性变体。
- [0077] 37. 项35的方法,其中所述第二作用剂是重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,所述颗粒包含编码RSP01或其功能性变体的载体。
- [0078] 38. 项37的方法,其中所述RSP01是截短的RSP01。
- [0079] 39. 项34的方法,其中所述第二作用剂增加所述哺乳动物眼的TM中的RSP02。
- [0080] 40. 项39的方法,其中所述第二作用剂是RSP02或其功能性变体。
- [0081] 41. 项39的方法,其中所述第二作用剂是重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,所述颗粒包含编码RSP02或其功能性变体的载体。
- [0082] 42. 项41的方法,其中所述RSP02是截短的RSP02。
- [0083] 43. 项34的方法,其中所述第二作用剂增加所述哺乳动物眼的TM中的RSP03。
- [0084] 44. 项43的方法,其中所述第二作用剂是RSP03或其功能性变体。
- [0085] 45. 项43的方法,其中所述第二作用剂是重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,所述颗粒包含编码RSP03或其功能性变体的载体。
- [0086] 46. 项45的方法,其中所述RSP03是截短的RSP03。
- [0087] 47. 项34的方法,其中所述第二作用剂增加所述哺乳动物眼的TM中的RSP04。
- [0088] 48. 项47的方法,其中所述第二作用剂是RSP04或其功能性变体。
- [0089] 49. 项47的方法,其中所述第二作用剂是重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,所述颗粒包含编码RSP04或其功能性变体的载体。
- [0090] 50. 项49的方法,其中所述RSP04是截短的RSP04。
- [0091] 51. 用于治疗哺乳动物中肌纤蛋白(MYOC)青光眼的方法,包括对所述哺乳动物的眼施用重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,所述颗粒包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的载体。
- [0092] 52. 用于治疗哺乳动物中的肌纤蛋白(MYOC)青光眼的方法,包括对所述哺乳动物的眼施用减少或抑制所述哺乳动物中肌纤蛋白(MYOC)的表达的作用剂。

[0093] 53. 用于治疗哺乳动物中肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的方法, 包括对所述哺乳动物的眼施用重组腺伴随病毒 (rAAV) 颗粒, 所述颗粒包含编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白 (MYOC) 的表达的MYOC RNAi的载体。

[0094] 54. 用于治疗哺乳动物中肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的方法, 包括对所述哺乳动物的眼施用在所述哺乳动物的眼中增加Wnt信号传导的作用剂和和所述哺乳动物中减少或抑制肌纤蛋白表达的作用剂。

[0095] 55. 用于治疗哺乳动物中肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的方法, 包括对所述哺乳动物的眼施用包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的载体的重组腺伴随病毒 (rAAV) 颗粒, 和包含编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白的表达的MYOC RNAi的载体的rAAV颗粒。

[0096] 56. 用于治疗哺乳动物中肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的方法, 包括对所述哺乳动物的眼施用重组腺伴随病毒 (rAAV) 颗粒, 所述颗粒包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体, 和编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白的表达的MYOC shRNA (MYOC shRNA) 的载体。

[0097] 57. 用于在具有眼部病症的哺乳动物中的小梁网细胞中增强Wnt信号传导的方法, 包括对所述哺乳动物的眼施用重组腺伴随病毒 (rAAV) 颗粒, 所述颗粒包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的载体。

[0098] 58. 用于在具有眼部病症的哺乳动物中的小梁网细胞中增强Wnt信号传导的方法, 包括对所述哺乳动物的眼施用重组腺伴随病毒 (rAAV) 颗粒, 所述颗粒包含编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白 (MYOC) 表达的MYOC RNAi的载体。

[0099] 59. 用于在具有眼部病症的哺乳动物中的小梁网细胞中增强Wnt信号传导的方法, 包括对所述哺乳动物的眼施用包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的载体的重组腺伴随病毒 (rAAV) 颗粒, 和包含编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白的表达的MYOC RNAi的载体的rAAV颗粒。

[0100] 60. 用于在具有眼部病症的哺乳动物中的小梁网细胞中增强Wnt信号传导的方法, 包括对所述哺乳动物的眼施用重组腺伴随病毒 (rAAV) 颗粒, 所述颗粒包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体和编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白的表达的MYOC RNAi的载体。

[0101] 61. 项1-60任一项的方法, 其中所述哺乳动物是人。

[0102] 62. 项1-56任一项的方法, 其中所述哺乳动物是人且所述肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼与人肌纤蛋白中的突变相关。

[0103] 63. 项57-60任一项的方法, 其中所述哺乳动物是人且所述眼部病症是与人类肌纤蛋白中的突变相关的MYOC青光眼。

[0104] 64. 项62或63的方法, 其中所述肌纤蛋白突变包含选自下述的一个或多个氨基酸取代: E323K、K398R、Q368X、G364V、P370L、D380A、K423E、Y437H和I477S。

[0105] 65. 项62-64任一项的方法, 其中所述肌纤蛋白突变包含P370L氨基酸取代。

[0106] 66. 项62或63的方法, 其中所述肌纤蛋白突变包含Y437H氨基酸取代。

[0107] 67. 项1-66任一项的方法, 其中所述肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼是原发性开角型青光眼 (POAC)。

[0108] 68. 项1-67任一项的方法,其中所述肌纤蛋白(MYOC)青光眼是幼年型原发性开角型青光眼(JOAC)。

[0109] 69. 项3-7、34-38、51、55-57或59-68任一项的方法,其中所述RSP01是人RSP01。

[0110] 70. 项69的方法,其中所述RSP01与人RSP01具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸序列同一性。

[0111] 71. 项3-7、34-38、51、55-57或59-70任一项的方法,其中所述RSP01包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0112] 72. 项3-7、34-38、51、55-57或59-70任一项的方法,其中所述RSP01包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0113] 73. 项3-7、34-38、51、55-57或59-70任一项的方法,其中所述RSP01包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0114] 74. 项3-7、34-38、51、55-57或59-70任一项的方法,其中所述RSP01包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0115] 75. 项3-7、34-38、51、55-57或59-70任一项的方法,其中所述RSP01包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0116] 76. 项3-7、34-38、51、55-57或59-70任一项的方法,其中所述RSP01包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0117] 77. 项3、8-11、34、39-42、51、55-57或59-70任一项的方法,其中所述RSP02是人RSP02。

[0118] 78. 项77的方法,其中所述RSP02与人RSP02具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性。

[0119] 79. 项3、8-11、34、39-42、51、55-57、59-68或78任一项的方法,其中所述RSP02包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0120] 80. 项3、8-11、34、39-42、51、55-57、59-68或78任一项的方法,其中所述RSP02包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0121] 81. 项3、8-11、34、39-42、51、55-57、59-68或78任一项的方法,其中所述RSP02包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0122] 82. 项3、8-11、34、39-42、51、55-57、59-68或78任一项的方法,其中所述RSP02包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0123] 83. 项3、8-11、34、39-42、51、55-57、59-68或78任一项的方法,其中所述RSP02包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0124] 84. 项3、8-11、34、39-42、51、55-57、59-68或78任一项的方法,其中所述RSP02包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0125] 85. 项3、12-15、34、43-46、51、55-57或59-68任一项的方法,其中所述RSP03是人RSP03。

[0126] 86. 项85的方法,其中所述RSP03与人RSP03具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸序列同一性。

[0127] 87. 项3、12-15、34、43-46、51、55-57、59-68或86任一项的方法,其中所述RSP03包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0128] 88. 项3、12-15、34、43-46、51、55-57、59-68或86任一项的方法,其中所述RSP03包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0129] 89. 项3、12-15、34、43-46、51、55-57、59-68或86任一项的方法,其中所述RSP03包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0130] 90. 项3、12-15、34、43-46、51、55-57、59-68或86任一项的方法,其中所述RSP03包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0131] 91. 项3、12-15、34、43-46、51、55-57、59-68或86任一项的方法,其中所述RSP03包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0132] 92. 项3、12-15、34、43-46、51、55-57、59-68或86任一项的方法,其中所述RSP03包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0133] 93. 项3、12-15、34、43-46、51、55-57、59-68或86任一项的方法,其中所述RSP03包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0134] 94. 项3、12-15、34、43-46、51、55-57、59-68或86任一项的方法,其中所述RSP03包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0135] 95. 项3、16-19、34、47-50、51、55-57或59-68任一项的方法,其中所述RSP04是人RSP04。

[0136] 96. 项95的方法,其中所述RSP04与人RSP04具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸序列同一性。

[0137] 97. 项3、16-19、34、47-50、51、55-57、59-68或96任一项的方法,其中所述RSP04包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0138] 98. 项3、16-19、34、47-50、51、55-57、59-68或96任一项的方法,其中所述RSP04包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0139] 99. 项3、16-19、34、47-50、51、55-57、59-68或96任一项的方法,其中所述RSP04包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0140] 100. 项3、16-19、34、47-50、51、55-57、59-68或96任一项的方法,其中所述RSP04包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0141] 101. 项3、16-19、34、47-50、51、55-57、59-68或96任一项的方法,其中所述RSP04包

含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0142] 102. 项3、16-19、34、47-50、51、55-57、59-68或96任一项的方法,其中所述RSP04包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0143] 103. 项3-19、34-51、55-57或59-102任一项的方法,其中所述RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体与启动子可操作连接。

[0144] 104. 项103的方法,其中所述启动子能够在所述哺乳动物的眼中表达RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体。

[0145] 105. 项104的方法,其中所述启动子能够在小梁网的细胞中表达RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体。

[0146] 106. 项103-105任一项的方法,其中所述启动子是杂交鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子。

[0147] 107. 项25、26、30、31、53、55、58或60-68任一项的方法,其中所述MYOC RNAi靶向人MYOC的表达。

[0148] 108. 项25、26、30、31、53、55、58、60-68或107任一项的方法,其中所述RNAi是小抑制性RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)或小发夹RNA(shRNA)。

[0149] 109. 项108的方法,其中所述RNAi是shRNA。

[0150] 110. 项109的方法,其中所述MYOC shRNA靶向SEQ ID NO:6所示的MYOC的氨基酸序列。

[0151] 111. 项109或110的方法,其中所述MYOC shRNA包含SEQ ID NO:7的环序列。

[0152] 112. 项25、26、30、31、53、55、58、60-68或107-111任一项的方法,其中所述MYOC RNAi与启动子可操作地连接。

[0153] 113. 项112的方法,其中所述启动子能够在所述哺乳动物的眼中表达MYOC RNAi。

[0154] 114. 项112或113任一项的方法,其中所述启动子能够在小梁网的细胞中表达MYOC RNAi。

[0155] 115. 项112-114任一项的方法,其中所述启动子是杂交鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子。

[0156] 116. 项112-115任一项的方法,其中所述启动子是RNA聚合酶III启动子。

[0157] 117. 项112-116任一项的方法,其中MYOC RNAi的表达减少或抑制所述哺乳动物眼中MYOC的表达。

[0158] 118. 项112-117任一项的方法,其中MYOC RNAi的表达减少或抑制所述哺乳动物的小梁网的细胞中MYOC的表达。

[0159] 119. 项1-118任一项的方法,其中所述治疗减少肌纤蛋白(MYOC)青光眼的症状。

[0160] 120. 项119的方法,其中所述肌纤蛋白(MYOC)青光眼症状的减少是眼内压的减少、小梁网中MYOC的减少积累、减少的眼高压或来自小梁网的增加的房水外流。

[0161] 121. 项6-51、53或55-120任一项的方法,其中所述AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6 ShH10、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、牛AAV、山羊AAV或小鼠AAV血清型衣壳或来自进化枝A-F的AAV血清型衣壳。

[0162] 122. 项6-51、53或55-120任一项的方法,其中所述AAV病毒颗粒包含酪氨酸衣壳突

变体、肝素结合衣壳突变体、AAV2R471A衣壳、AAVAHV2/2-7m8衣壳、AAV DJ衣壳、AAV2 N587A衣壳、AAV2 E548A衣壳、AAV2 N708A衣壳、AAV V708K衣壳、AAV1/AAV2嵌合衣壳或AAV2/HBoV1衣壳。

[0163] 123. 项6-51、53或55-120任一项的方法,其中所述AAV病毒颗粒包含AAV衣壳,所述AAV衣壳在位置R484、R487、K527、K532、R585或R588的一处或多处包含氨基酸取代,其编号基于AAV2的VP1。项6-51、53或55-102任一项的方法,其中所述AAV病毒颗粒包含酪氨酸衣壳突变体。

[0164] 124. 项121的方法,其中所述rAAV病毒颗粒包含AAV血清型2衣壳。

[0165] 125. 项124的方法,其中AAV血清型2衣壳包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其相对AAV2 VP1编号。

[0166] 126. 项6-51、53或55-125任一项的方法,其中所述载体包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型反向末端重复(ITR)。

[0167] 127. 项126的方法,其中所述载体包含AAV血清型2ITR。

[0168] 128. 项6-51、53或55-127任一项的方法,其中所述AAV病毒颗粒包含源自相同AAV血清型的一个或多个ITR和衣壳。

[0169] 129. 项6-51、53或55-128任一项的方法,其中所述AAV病毒颗粒包含源自与rAAV病毒颗粒的衣壳不同AAV血清型的一个或多个ITR。

[0170] 130. 项128的方法,其中所述rAAV病毒颗粒包含AAV2衣壳且其中所述载体包含AAV2 ITR。

[0171] 131. 项124或130的方法,其中AAV2衣壳包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其相对AAV2 VP1编号。

[0172] 132. 项6-51、53或55-131任一项的方法,其中将至少 1×10^9 基因组拷贝的rAAV颗粒施用至所述哺乳动物。

[0173] 133. 项6-51、53或55-132任一项的方法,其中所述AAV颗粒通过玻璃体内注射和/或房内注射施用。

[0174] 134. 项6-51、53或55-133任一项的方法,其中将所述rAAV施用至所述眼的多于一处的位置。

[0175] 135. 项6-51、53或55-134任一项的方法,其中所述rAAV病毒颗粒在药物组合物中。

[0176] 136. 项135的方法,其中所述药物组合物进一步包含药物上可接受的载剂。

[0177] 137. 项1-136任一项的方法,其中所述作用剂与增加RSP01、RSP02、RSP03和/或RSP04活性的第二作用剂组合使用。

[0178] 138. 包含AAV载体的重组AAV颗粒,其中所述AAV载体包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的核酸。

[0179] 139. 包含AAV载体的重组AAV颗粒,其中所述AAV载体包含编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白(MYOC)的表达的抑制性核酸的核酸。

[0180] 140. 项139的重组颗粒,其中靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白(MYOC)的表达的抑制性核酸是RNAi。

[0181] 141. 包含AAV载体的重组AAV颗粒,其中所述AAV载体包含编码RSP01、RSP02、

RSP03、RSP04或其功能性变体和编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白 (MYOC) 的表达的抑制性核酸的核酸。

[0182] 142. 项141的重组AAV颗粒, 其中在所述哺乳动物中靶向肌纤蛋白 (MYOC) 的表达的抑制性核酸是RNAi。

[0183] 143. 项140-142任一项的重组AAV颗粒, 其中所述MYOC RNAi靶向人MYOC的表达。

[0184] 144. 项140-143任一项的重组AAV颗粒, 其中所述MYOC RNAi靶向SEQ ID NO:6所示的MYOC的氨基酸序列。

[0185] 145. 项140-144任一项的重组AAV颗粒, 其中所述RNAi是小抑制性RNA (siRNA)、微小RNA (miRNA) 或小发夹RNA (shRNA)。

[0186] 146. 项140-145任一项的重组AAV颗粒, 其中所述RNAi是shRNA。

[0187] 147. 项146的重组AAV颗粒, 其中所述MYOC shRNA包含SEQ ID NO:7的环序列。

[0188] 148. 项138或141-147任一项的重组AAV颗粒, 其中所述AAV载体包含编码RSP01或其功能性变体的核酸, 且其中所述RSP01或其功能性变体是人RSP01。

[0189] 149. 项138或141-148任一项的重组AAV颗粒, 其中所述AAV载体包含编码RSP01或其功能性变体的核酸, 且其中所述RSP01或其功能性变体包含SEQ ID NO:8、11和/或12的氨基酸序列。

[0190] 150. 项148的重组AAV颗粒, 其中所述RSP01包含与SEQ ID No:8、11和/或12的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0191] 151. 项138或141-147任一项的重组AAV颗粒, 其中所述AAV载体包含编码RSP02或其功能性变体的核酸, 且其中所述RSP02或其功能性变体是人RSP02。

[0192] 152. 项138、141-147或151任一项的重组AAV颗粒, 其中所述AAV载体包含编码RSP02或其功能性变体的核酸, 且其中所述RSP02或其功能性变体包含SEQ ID NO:9、13和/或14的氨基酸序列。

[0193] 153. 项151的重组AAV颗粒, 其中所述RSP02包含与SEQ ID NO:9、13和/或14的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0194] 154. 项138或141-147任一项的重组AAV颗粒, 其中所述AAV载体包含编码RSP03或其功能性变体的核酸, 且其中所述RSP03或其功能性变体是人RSP03。

[0195] 155. 项138、141-147或154任一项的重组AAV颗粒, 其中所述AAV载体包含编码RSP03或其功能性变体的核酸, 且其中所述RSP03或其功能性变体包含SEQ ID NO:1和/或15-17的氨基酸序列。

[0196] 156. 项154的重组AAV颗粒, 其中所述RSP03包含与SEQ ID NO:1和/或15-17的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0197] 157. 项138或141-147任一项的重组AAV颗粒, 其中所述AAV载体包含编码RSP04的核酸, 且其中所述RSP04是人RSP04。

[0198] 158. 项138、141-147或157任一项的重组AAV颗粒, 其中所述AAV载体包含编码RSP04或其功能性变体的核酸, 且其中所述RSP04或其功能性变体包含SEQ ID NO:10、18和/

或19的氨基酸序列。

[0199] 159. 项157的重组AAV颗粒,其中所述RSP04包含与SEQ ID NO:10.18和/或19的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0200] 160. 项138或141-159任一项的重组AAV颗粒,其中所述RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体与启动子可操作连接。

[0201] 161. 项160的重组AAV颗粒,其中所述启动子能够在所述哺乳动物的眼中表达RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体。

[0202] 162. 项160或161的重组AAV颗粒,其中所述启动子能够在小梁网的细胞中表达RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体。

[0203] 163. 项160-162任一项的重组AAV颗粒,其中所述启动子是杂交鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子。

[0204] 164. 项140-147任一项的重组AAV颗粒,其中所述MYOC RNAi与启动子可操作连接。

[0205] 165. 项164的重组AAV颗粒,其中所述启动子能够在所述哺乳动物的眼中表达MYOC RNAi。

[0206] 166. 项164或165的重组AAV颗粒,其中所述启动子能够在小梁网的细胞中表达MYOC RNAi。

[0207] 167. 项164-166任一项的重组AAV颗粒,其中所述启动子是杂交鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子。

[0208] 168. 项164-166任一项的重组AAV颗粒,其中所述启动子是RNA聚合酶III启动子。

[0209] 169. 项164-168任一项的重组AAV颗粒,其中所述MYOC RNAi的表达减少或抑制所述哺乳动物眼中MYOC的表达。

[0210] 170. 项164-169任一项的重组AAV颗粒,其中所述MYOC RNAi的表达减少或抑制所述哺乳动物的小梁网的细胞中MYOC的表达。

[0211] 171. 项138-170任一项的重组AAV颗粒方法,其中所述AAV病毒颗粒包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6 ShH10、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、牛AAV、山羊AAV或小鼠AAV血清型衣壳或来自进化枝A-F的AAV血清型衣壳。

[0212] 172. 项138-170任一项的重组AAV颗粒方法,其中所述AAV病毒颗粒包含发夹结合衣壳突变体、AAV2R471A衣壳、AAVAAV2/2-7m8衣壳、AAV DJ衣壳、AAV2 N587A衣壳、AAV2 E548A衣壳、AAV2 N708A衣壳、AAV V708K衣壳、AAV1/AAV2嵌合衣壳或AAV2/HBoV1衣壳。

[0213] 173. 项138-170任一项的重组AAV颗粒方法,其中所述AAV病毒颗粒包含AAV衣壳,所述AAV衣壳在位置R484、R487、K527、K532、R585或R588的一处或多处包含氨基酸取代,其基于AAV2的VP1编号。

[0214] 174. 项138-170任一项的重组AAV颗粒方法,其中所述AAV病毒颗粒包含赖氨酸衣壳突变体。

[0215] 175. 项171的重组AAV颗粒,其中所述rAAV病毒颗粒包含AAV血清型2衣壳。

[0216] 176. 项175的重组AAV颗粒,其中AAV血清型2衣壳包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其相对AAV2 VP1编号。

- [0217] 177. 项138-176任一项的重组AAV颗粒,其中所述载体包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型反向末端重复(ITR)。
- [0218] 178. 项177的重组AAV颗粒,其中所述载体包含AAV血清型2ITR。
- [0219] 179. 项138-178任一项的重组AAV颗粒,其中所述AAV病毒颗粒包含源自相同AAV血清型的一个或多个ITR和衣壳。
- [0220] 180. 项138-178任一项的重组AAV颗粒,其中所述AAV病毒颗粒包含源自与rAAV病毒颗粒的衣壳不同AAV血清型的一个或多个ITR。
- [0221] 181. 项179的重组AAV颗粒,其中所述rAAV病毒颗粒包含AAV2衣壳,且其中所述载体包含AAV2 ITR。
- [0222] 182. 项175或181的重组AAV颗粒,其中所述AAV2衣壳包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其相对AAV2 VP1编号。
- [0223] 183. 项138-154任一项的重组AAV颗粒,其用于在项6-51、53或55-137任一项的方法中的用途。
- [0224] 184. 包含项138-183任一项的重组AAV颗粒的药物组合物。
- [0225] 185. 适用于项1-137任一项的方法的药物组合物。
- [0226] 186. 项184或185的药物组合物在制造用于治疗哺乳动物中的肌纤蛋白(MYOC)青光眼的药物中的用途。
- [0227] 187. 项138-182任一项的重组AAV在制造用于治疗哺乳动物中的肌纤蛋白(MYOC)青光眼的药物中的用途。
- [0228] 188. 项184或185的药物组合物用于治疗哺乳动物中肌纤蛋白(MYOC)青光眼的用途。
- [0229] 189. 项138-182任一项的重组AAV用于治疗哺乳动物中肌纤蛋白(MYOC)青光眼的用途。
- [0230] 190. 项186-189任一项用于项6-51、53或55-137任一项的方法的用途。
- [0231] 191. 项186-190任一项的用途,其中所述哺乳动物是人。
- [0232] 192. 项186-191任一项的用途,其中所述肌纤蛋白(MYOC)青光眼是原发性开角型肌纤蛋白(MYOC)青光眼(POAC)。
- [0233] 193. 项186-192任一项的用途,其中所述青光眼是幼年型原发性开角型青光眼(JOAC)。
- [0234] 194. 项187-193任一项的用途,其中所述重组AAV与增加RSP01、RSP02、RSP03和/或RSP04的活性的作用剂组合使用。
- [0235] 195. 用于治疗哺乳动物中肌纤蛋白(MYOC)青光眼的试剂盒,其包含含有编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的载体的rAAV病毒颗粒。
- [0236] 196. 用于治疗哺乳动物中肌纤蛋白(MYOC)青光眼的试剂盒,其包含含有AAV载体的rAAV病毒颗粒,其中所述AAV载体包含编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白(MYOC)的表达的抑制性核酸的核酸。
- [0237] 197. 项195的试剂盒,其中所述抑制性核酸是MYOC RNAi。
- [0238] 198. 用于治疗哺乳动物中肌纤蛋白(MYOC)青光眼的试剂盒,其包含含有AAV载体

的rAAV病毒颗粒,其中所述AAV载体包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体和编码靶向所述哺乳动物中肌纤蛋白(MYOC)的表达的抑制性核酸核酸。

[0239] 199.项198的试剂盒,其中所述抑制性核酸是MYOC RNAi。

[0240] 200.项196-199任一项的试剂盒,其中所述MYOC RNAi靶向人MYOC的表达。

[0241] 201.项200的试剂盒,其中所述MYOC RNAi靶向SEQ ID NO:6所示的MYOC的氨基酸序列。

[0242] 202.项197或199-201任一项的试剂盒,其中所述RNAi是小抑制性RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)或小发夹RNA(shRNA)。

[0243] 203.项168或199-202任一项的试剂盒,其中所述RNAi是shRNA。

[0244] 204.项203的试剂盒,其中所述MYOC shRNA包含SEQ ID NO:7的环序列。

[0245] 205.项195或198-204任一项的试剂盒,其中所述AAV载体包含编码RSP01或其功能性变体的核酸,且其中所述RSP01或其功能性变体是人RSP01。

[0246] 206.项195或198-205任一项的试剂盒,其中所述AAV载体包含编码RSP01或其功能性变体的核酸,且其中所述RSP01或其功能性变体包含SEQ ID NO:8、11和/或12的氨基酸序列。

[0247] 207.项205的试剂盒,其中所述RSP01包含与SEQ ID NO:8、11和/或12的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0248] 208.项195或198-204任一项的试剂盒,其中所述AAV载体包含编码RSP02或其功能性变体的核酸,且其中所述RSP02或其功能性变体是人RSP02。

[0249] 209.项195、198-204或208任一项的试剂盒,其中所述AAV载体包含编码RSP02或其功能性变体的核酸,且其中所述RSP02或其功能性变体包含SEQ ID NO:9、13和/或14的氨基酸序列。

[0250] 210.项208的试剂盒,其中所述RSP02包含与SEQ ID NO:9、13和/或14的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0251] 211.项195或198-204任一项的试剂盒,其中所述AAV载体包含编码RSP03或其功能性变体的核酸,且其中所述RSP03或其功能性变体是人RSP03。

[0252] 212.项195、198-204或211任一项的试剂盒,其中所述AAV载体包含编码RSP03或其功能性变体的核酸,且其中所述RSP03或其功能性变体包含SEQ ID NO:1和/或15-17的氨基酸序列。

[0253] 213.项211的试剂盒,其中所述RSP03包含与SEQ ID NO:1和/或15-17的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0254] 214.项195或198-204任一项的试剂盒,其中所述AAV载体包含编码RSP04或其功能性变体的核酸,且其中所述RSP04或其功能性变体是人RSP04。

[0255] 215.项195、198-204或214任一项的试剂盒,其中所述AAV载体包含编码RSP04或其功能性变体的核酸,且其中所述RSP04或其功能性变体包含SEQ ID NO:10、18和/或19的氨基酸序列。

- [0256] 216. 项214的试剂盒,其中所述RSP01包含与SEQ ID NO:10、18和/或19的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。
- [0257] 217. 项196或198-216任一项的试剂盒,其中所述RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体与启动子可操作连接。
- [0258] 218. 项217的试剂盒,其中所述启动子能够在所述哺乳动物的眼中表达RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体。
- [0259] 219. 项217或218的试剂盒,其中所述启动子能够在小梁网的细胞中表达RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体。
- [0260] 220. 项217-219任一项的试剂盒,其中所述启动子是杂交鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子。
- [0261] 221. 项197或199-204任一项的试剂盒,其中所述MYOC RNAi与启动子可操作连接。
- [0262] 222. 项221的试剂盒,其中所述启动子能够在所述哺乳动物眼中表达MYOC RNAi。
- [0263] 223. 项221或222的试剂盒,其中所述启动子能够在小梁网的细胞中表达MYOC RNAi。
- [0264] 224. 项221-223任一项的试剂盒,其中所述启动子是杂交鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子。
- [0265] 225. 项221-223任一项的试剂盒,其中所述启动子是RNA聚合酶III启动子。
- [0266] 226. 项221-225任一项的试剂盒,其中所述MYOC RNAi的表达减少或抑制所述哺乳动物的眼中MYOC的表达。
- [0267] 227. 项221-226任一项的试剂盒,其中所述MYOC RNAi的表达减少或抑制所述哺乳动物的小梁网的细胞中MYOC的表达。
- [0268] 228. 项221-227任一项的试剂盒,其中所述AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6 ShH10、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、牛AAV、山羊AAV或小鼠AAV血清型衣壳或来自进化枝A-F的AAV血清型衣壳。
- [0269] 229. 项221-227任一项的试剂盒,其中所述AAV病毒颗粒包含发夹结合衣壳突变体、AAV2R471A衣壳、AAVA2/2-7m8衣壳、AAV DJ衣壳、AAV2N587A衣壳、AAV2 E548A衣壳、AAV2 N708A衣壳、AAV V708K衣壳、AAV1/AAV2嵌合衣壳或AAV2/HBoV1衣壳。
- [0270] 230. 项221-227任一项的试剂盒,其中所述AAV病毒颗粒包含AAV衣壳,所述AAV衣壳在位置R484、R487、K527、K532、R585或R588的一处或多处包含氨基酸取代,其基于AAV2的VP1编号。
- [0271] 231. 项221-227任一项的试剂盒,其中所述AAV病毒颗粒包含酪氨酸衣壳突变体。
- [0272] 232. 项228的试剂盒,其中所述rAAV病毒颗粒包含AAV血清型2衣壳。
- [0273] 233. 项232的试剂盒,其中所述AAV血清型2衣壳包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其相对于AAV2 VP1编号。
- [0274] 234. 项221-233任一项的试剂盒,其中所述载体包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型反向末端重复(ITR)。
- [0275] 235. 项234的试剂盒,其中所述载体包含AAV血清型2ITR。

- [0276] 236. 项221-235任一项的试剂盒,其中所述AAV病毒颗粒包含源自相同AAV血清型的一个或多个ITR和衣壳。
- [0277] 237. 项221-235任一项的试剂盒,其中所述AAV病毒颗粒包含源自与rAAV病毒颗粒的衣壳不同AAV血清型的一个或多个ITR。
- [0278] 238. 项236的试剂盒,其中所述rAAV病毒颗粒包含AAV2衣壳,且其中所述载体包含AAV2 ITR。
- [0279] 239. 项232或238的试剂盒,其中AAV2衣壳包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其相对于AAV2 VP1编号。
- [0280] 240. 试剂盒,其适用于在项6-51、53或55-137任一项的方法中使用。
- [0281] 241. 包含项138-183任一项的重组AAV颗粒的试剂盒。
- [0282] 242. 项195-241任一项的试剂盒,其进一步包含用于在治疗肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼中使用的说明。
- [0283] 243. 项195-242任一项的试剂盒,其进一步包含缓冲液和/或药物上可接受的赋形剂。
- [0284] 244. 项195-243任一项的试剂盒,其中所述重组AAV与增加RSP01、RSP02、RSP03和/或RSP04活性的作用剂组合使用。
- [0285] 245. 将核酸递送至哺乳动物眼的小梁网的方法,包括将含有rAAV载体的AAV血清型2 (AAV2) 颗粒施用至所述哺乳动物的眼,其中所述rAAV载体包含核酸,且其中所述AAV2颗粒包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其基于AAV2的VP1编号。
- [0286] 246. 项245的方法,其中所述核酸编码治疗性转基因。
- [0287] 247. 治疗哺乳动物中眼部病症的方法,其包括将含有rAAV载体的AAV2颗粒施用至所述哺乳动物的眼,其中所述rAAV载体包含编码治疗性转基因的核酸,且其中所述AAV2颗粒包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其基于AAV2的VP1编号。
- [0288] 248. 项245-247任一项的方法,其中所述rAAV颗粒转导所述眼的小梁网的细胞。
- [0289] 249. 项246-248任一项的方法,其中所述治疗性转基因在所述眼的小梁网中表达。
- [0290] 250. 项249的方法,其中所述治疗性转基因编码治疗性多肽或治疗性核酸。
- [0291] 251. 项250的方法,其中所述眼部病症是与所述眼的小梁网相关的病症。
- [0292] 252. 项250或251的方法,其中所述眼部病症是肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼。
- [0293] 253. 项245-252任一项的方法,其中所述哺乳动物是人。
- [0294] 254. 项245-253任一项的方法,其中所述AAV颗粒的施用玻璃体内和/或房内施用。
- [0295] 255. 用于将核酸递送至哺乳动物眼的小梁网的重组AAV2颗粒,其中所述AAV2颗粒包含rAAV载体,其中所述rAAV载体包含核酸,且其中所述AAV2颗粒包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其基于AAV2的VP1编号。
- [0296] 256. 项255的rAAV2颗粒,其中所述核酸编码治疗性转基因。
- [0297] 257. 用于治疗哺乳动物中眼部病症的重组AAV2颗粒,其中所述AAV2颗粒包含rAAV载体,其中所述rAAV载体包含编码治疗性转基因的核酸,且其中所述AAV2颗粒包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其基于AAV2的VP1编号。
- [0298] 258. 项255-257任一项的rAAV颗粒,其中所述rAAV颗粒转导所述眼的小梁网的细胞。

- [0299] 259. 项256-258任一项的rAAV颗粒,其中所述治疗性转基因在所述眼的小梁网中表达。
- [0300] 260. 项257的rAAV颗粒,其中所述眼部病症是与所述眼的小梁网相关的病症。
- [0301] 261. 项257或258的rAAV颗粒,其中所述眼部病症是肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼。
- [0302] 262. 项255-261任一项的rAAV颗粒,其中所述哺乳动物是人。
- [0303] 263. 重组AAV2颗粒用于将核酸递送至哺乳动物眼小梁网的用途,其中所述AAV2颗粒包含rAAV载体,其中所述rAAV载体包含所述核酸,且其中所述AAV2颗粒包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其基于AAV2的VP1编号。
- [0304] 264. 项263的用途,其中所述核酸编码治疗性转基因。
- [0305] 265. 重组AAV2颗粒用于治疗哺乳动物中的眼部病症的用途,其中所述AAV2颗粒包含rAAV载体,其中所述rAAV载体包含编码治疗性转基因的核酸,且其中所述AAV2颗粒包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其基于AAV2的VP1编号。
- [0306] 266. 项263-265任一项的用途,其中所述rAAV颗粒转导所述眼的小梁网的细胞。
- [0307] 267. 项264-266任一项的用途,其中所述治疗性转基因在所述眼的小梁网中表达。
- [0308] 268. 项265的用途,其中所述眼部病症是与所述眼的小梁网相关的病症。
- [0309] 269. 项265或268的用途,其中所述眼部病症是肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼。
- [0310] 270. 项263-269任一项的用途,其中所述哺乳动物是人。
- [0311] 271. 项263-270任一项的用途,其中所述AAV颗粒用于玻璃体内和/或房内施用。
- [0312] 272. 将核酸递送至哺乳动物眼的小梁网的试剂盒,包含含有rAAV载体的rAAV2颗粒,其中所述rAAV载体包含核酸,且其中所述AAV2颗粒包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其基于AAV2的VP1编号。
- [0313] 273. 项272的试剂盒,其中所述核酸编码治疗性转基因。
- [0314] 274. 用于治疗哺乳动物中的眼部病症的试剂盒,其包含含有rAAV载体的rAAV2颗粒,其中所述rAAV载体包含编码治疗性转基因的核酸,且其中所述AAV2颗粒包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳蛋白,其基于AAV2的VP1编号。
- [0315] 275. 项272-274任一项的试剂盒,其中所述rAAV颗粒转导所述眼的小梁网的细胞。
- [0316] 276. 项273-275任一项的试剂盒,其中所述治疗性转基因在所述眼的小梁网中表达。
- [0317] 277. 项274的试剂盒,其中所述眼部病症是与所述眼的小梁网相关的病症。
- [0318] 278. 项274或277的试剂盒,其中所述眼部病症是肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼。
- [0319] 279. 项272-278任一项的试剂盒,其中所述哺乳动物是人。
- [0320] 280. 项272-279任一项的试剂盒,其进一步包含使用说明。
- [0321] 281. 项272-280任一项的试剂盒,其进一步包含缓冲液和/或药物上可接受的赋形剂。
- [0322] 附图简述
- [0323] 图1证明MYOC突变体P370L和Y437H是不分泌的且阻断野生型MYOC (“wtMYOC”) 的分泌。来自使用表达wtMYOC和/或MYOC突变体(如标记)的构建体转染的293细胞的细胞培养基或细胞裂解物通过蛋白免疫印迹使用抗人MYOC抗体探测。
- [0324] 图2显示MYOC突变体P370L是不分泌的且阻断293T和SV40 T-抗原转化的人小梁网

(“hTM-T”)细胞两者中野生型MYOC(“wtMYOC”)的分泌。来自使用表达wtMYOC和/或P370L MYOC(如标记)的构建体转染的293T或hTM-T细胞的细胞培养基或细胞裂解物通过蛋白免疫印迹使用抗人MYOC抗体探测。

[0325] 图3描述了wtMYOC、P370L MYOC或Y437H表达对Wnt信号传导的影响。对于每个实验,“无mWnt3a”条形图在左侧,且“w mWnt3a-400ng/ml”条形图在右侧。

[0326] 图4显示RSP03表达可在与P370L或Y437H MYOC共表达时恢复Wnt信号传导。对于每个实验,“无mWnt3a”条形图在左侧,且“wmWnt3a-400ng/ml”条形图在右侧。

[0327] 图5显示RSP03表达可在与P370L MYOC共表达时恢复hTM-T细胞中的Wnt信号传导。对于每个实验,“无mWnt3a”条形图在左侧,且“400ng/ml hWnt3a”条形图在右侧。

[0328] 图6显示MYOC shRNA对293T细胞中MYOC表达的影响。来自293T细胞的细胞培养基或细胞裂解物经由蛋白免疫印迹使用抗人MYOC抗体探测。细胞使用表达wtMYOC(条带1);wtMYOC和MYOC shRNA#79(2);wtMYOC和MYOC shRNA#93(3);wtMYOC和乱序shRNA对照(4);或EGFP(5)的质粒转染。55/57kD的条带代表完整大小的MYOC蛋白的糖基化(57kD)和非糖基化(55kD)形式。22kD的条带代表钙蛋白酶II裂解产物的N-末端。

[0329] 图7显示MYOC shRNA对hTM-T细胞中MYOC表达的影响。来自hTM-T细胞的细胞培养基或细胞裂解物经由蛋白免疫印迹使用抗人MYOC抗体探测。细胞使用表达wtMYOC(条带1);P370L MYOC(2);wtMYOC和P370L MYOC(3);wtMYOC和P370L MYOC和Grp94 shRNA#1(4);wtMYOC和P370L MYOC和Grp94 shRNA#2(5);wtMYOC和P370L MYOC和MYOC shRNA#53(6);wtMYOC和P370L MYOC和pGIPZ MYOC shRNA#79(7);wtMYOC和P370L MYOC和pGIPZ MYOC shRNA#93(8);wtMYOC和P370L MYOC和乱序shRNA对照(9);或EGFP(10)的质粒转染。

[0330] 图8显示RSP03表达和MYOC沉默与P370L MYOC共表达时协同恢复Wnt信号传导。293T细胞用TOP-Flash报告构建体和wtMYOC(“MYOC”),加P370L MYOC、Grp94 shRNA、pGIPZ MYOC shRNAs#79(第一)和#93(第二)和/或RSP03质粒共转染,如标记。添加重组小鼠Wnt3a(400ng/ml)后扩增Wnt信号传导并通过TOP-Flash测定测量。转染后测量萤光素酶活性(平均值+SD,n=1-3重复孔)并标准化至组成型表达的海肾(Renilla)萤光素酶的转染对照的水平。对于每个实验,“无Wnt添加”条形图在左侧,且“添加400ng/ml Wnt3a”条形图在右侧。

[0331] 图9显示MYOC沉默与P370L或Y437H MYOC共表达时恢复Wnt信号传导。293T细胞使用TOP-Flash报告构建体和wtMYOC(“MYOC”),加P370L MYOC、Y437H MYOC、MYOC shRNA和/或乱序对照shRNA(“pGIPZ-无效”)共转染,如标记。添加重组小鼠Wnt3a(400ng/ml)后扩增Wnt信号传导并通过TOP-Flash测定测量。转染后测量萤光素酶活性(平均值+SD,n=1-3重复孔)并标准化至组成型表达的海肾萤光素酶的转染对照的水平。对于每个实验,“无Wnt添加”条形图在左侧,且“添加400ng/ml Wnt3a”条形图在右侧。

[0332] 图10显示通过野生型AAV2病毒颗粒(上图)和包含衣壳蛋白的R471A氨基酸取代的AAV2颗粒体外(左图)和体内(右图)转导小梁网的细胞。

[0333] 图11显示人RSP0家族蛋白的结构域图,其描述了弗林蛋白酶样富含Cys结构域、凝血酶敏感素1型结构域和C末端正电结构域,如标记(图改编自Kim,K.A.等(2008)Mol.Biol.Cell.19:2588-2596)。

[0334] 图12显示人RSP0家族基因的结构域图,其描述了图11所列的蛋白结构域。描绘了氨基酸序列编号,且针对每个家族成员测试的截短的突变体如标记(图改编自Kim,K.A.等

(2006)Cell Cycle 5:23-26)。

[0335] 图13A显示具有标记的信号序列、FU1、FU2和TSP1结构域的全长人RSP03 (SEQ ID NO:1)的序列。

[0336] 图13B显示具有标记的信号序列、FU1和FU2结构域的活性人RSP03片段 (SEQ ID NO:16)的序列。使用的缺乏信号肽的片段对应SEQ ID NO:16的氨基酸22-146,且包括His标签为15kDa。

[0337] 图13C描绘具有标记的信号肽、FU1、FU2、TSP1和BR结构域的全长hRSP03的结构域结构。每个结构域的推定功能列于下文。

[0338] 图13D显示全长hRSP03和hRSP03片段的蛋白免疫印迹。

[0339] 图14描绘测试的hRSP03片段。下文还提供了具有标记的信号肽、FU1、FU2、TSP1和BR结构域的全长hRSP03的结构域结构和为每个结构域推定的功能。

[0340] 图15显示全长RSP03和RSP03片段的表达与Y437H MYOC共表达时可恢复Wnt信号传导。

[0341] 图16显示RSP0家族成员的表达当与Y437H MYOC共表达时即使不添加Wnt3a也可诱导Wnt信号传导。

[0342] 发明详述

[0343] 本发明提供用于在哺乳动物中治疗肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的方法,包括对所述哺乳动物的眼部施用重组腺伴随病毒 (rAAV) 病毒颗粒。在一些实施方案中,哺乳动物眼中的Wnt信号传导增加;例如,通过表达R-脊椎蛋白1 (RSP01)、R-脊椎蛋白2 (RSP02)、R-脊椎蛋白3 (RSP03) 和/或R-脊椎蛋白4 (RSP04)。在一些实施方案中,肌纤蛋白 (MYOC) (例如突变体肌纤蛋白) 的表达受到抑制,例如通过使用RNAi靶向MYOC的表达。一些方面,AAV颗粒包含其中编码RSP01、RSP02、RSP03和/或RSP04和/或功能性变体的载体。其他方面,rAAV颗粒包含编码靶向哺乳动物中肌纤蛋白 (MYOC) 表达的MYOC RNAi (例如shRNA) 的载体。其他方面,本发明提供用于治疗哺乳动物中肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的方法,包括对所述哺乳动物的眼部施用包含其中编码RSP01、RSP02、RSP03和/或RSP04和/或功能性变体的载体的rAAV颗粒和包含编码靶向哺乳动物中肌纤蛋白的表达的MYOC RNAi (例如shRNA) 的载体的rAAV颗粒的混合物。其他方面,本发明提供用于在哺乳动物中治疗肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的方法,包括对所述哺乳动物的眼部施用rAAV颗粒,所述颗粒包含其中编码RSP01、RSP02、RSP03和/或RSP04和/或功能性变体和编码靶向哺乳动物中肌纤蛋白的表达的MYOC RNAi (例如shRNA) (MYOC shRNA) 的载体。本发明还提供使用其中编码RSP01、RSP02、RSP03和/或RSP04和/或功能性变体和/或MYOC RNAi (例如shRNA) 的rAAV载体用于治疗肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的组合物和试剂盒。本发明还提供重组AAV颗粒、组合物和试剂盒。

[0344] 一些方面,本发明提供靶向AAV2的方法以转导小梁网的细胞。一些方面,本发明提供含有R471A突变的rAAV2颗粒,其基于AAV2的VP1编号。在一些实施方案中,本发明提供使用含有突变的衣壳蛋白 (例如R471A氨基酸取代) 的AAV2病毒颗粒用于治疗与小梁网 (例如肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼) 相关的眼部疾病的方法和组合物。

[0345] I. 一般性技术

[0346] 本文描述和引用的技术和方法为本领域的技术人员一般充分理解的且使使用常规方法学所通常采用的,如例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual (Sambrook等,

第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,2012); Current Protocols in Molecular Biology (F.M.Ausubel等编,2003);Methods in Enzymology丛书(Academic Press,Inc.);PCR 2:A Practical Approach (M.J.MacPherson,B.D.Hames和G.R.Taylor编,1995);Antibodies,ALaboratory Manual (Harlow和Lane,编,1988);Culture of Animal Cells:AManual of Basic Technique and Specialized Applications (R.I.Freshney,第6版,J.Wiley and Sons,2010); Oligonucleotide Synthesis (M.J.Gait编,1984);Methods in Molecular Biology, Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook (J.E.Cellis编,Academic Press, 1998);Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P.Mather和P.E.Roberts,Plenum Press,1998);Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures (A.Doyle, J.B.Griffiths,和D.G.Newell,编,J.Wiley and Sons,1993-8);Handbook of Experimental Immunology (D.M.Weir和C.C.Blackwell,编,1996);Gene Transfer vectors for Mammalian Cells (J.M.Miller和M.P.Calos,编,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction, (Mullis等编,1994);Current Protocols in Immunology (J.E.Coligan等编,1991);Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel等编,J.Wiley and Sons, 2002);Immunobiology (C.A.Janeway等,2004);Antibodies (P.Finch,1997);Antibodies:A Practical Approach (D.Catty.编,IRL Press,1988-1989);Monoclonal Antibodies:A Practical Approach (P.Shepherd和C.Dean,编,Oxford University Press,2000);Using Antibodies:ALaboratory Manual (E.Harlow和D.Lane,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies (M.Zanetti和J.D.Capra,编,Harwood Academic Publishers,1995)和Cancer:Principles and Practice of Oncology (V.T.DeVita等编, J.B.Lippincott Company,2011)中所述的广泛采用的方法学。

[0347] II. 定义

[0348] 如本文使用的“载体”指包含待递送入宿主细胞(体外或体内)的核酸的重组质粒或病毒。

[0349] 如本文使用的术语“多核苷酸”或“核酸”指任何长度的聚合形式的核苷酸,其为核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。因此,该术语包括但不限于单、双或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂交物或包含嘌呤和嘧啶碱基或其他天然、化学或生化修饰的、非天然或衍生的核苷酸碱基的聚合物。核酸的骨架可包含糖和磷酸基团(如通常在RNA或DNA中所发现),或修饰或取代的糖或磷酸基团。可替换地,核酸的骨架可包含合成的亚单元如氨基磷酸的聚合物且因此可以是寡脱氧核苷氨基磷酸($P-NH_2$)或混合的氨基磷酸酯-磷酸二酯低聚物。此外,双链核酸可从化学合成(通过在适当的条件下合成互补链并退火该链,或使用DNA聚合酶以适当的引物从头开始合成互补链)的单链多核苷酸产物获得。

[0350] 术语“多肽”和“蛋白”可互换使用以指代氨基酸残基的聚合物,且不限于最小长度。这样的氨基酸残基聚合物可包含天然或非天然氨基酸残基,且包括但不限于氨基酸残基的肽、寡肽、二聚体、三聚体和多聚体。全长蛋白及其片段两者都由定义所涵盖。术语还包括多肽的表达后修饰,例如糖基化、唾液酸化、乙酰化、磷酸化等。此外,就本发明而言,“多肽”指包含对天然序列的修饰如缺失、添加和取代(一般在性质上是保守的)的蛋白,只要该蛋白保持预期活性。这些修饰可以是故意的,如通过定点诱变,或可以是偶然的,如通过产

生蛋白的宿主的突变或由于PCR扩增的错误。

[0351] “重组病毒载体”指包含一种或多种异源序列(即非病毒来源的核酸序列)的重组多核苷酸载体。在重组AAV载体的情况中,重组核酸侧翼为至少一个,优选两个反向末端重复序列(ITR)。

[0352] “重组AAV载体(rAAV载体)”指含有一个或多个异源序列(即非AAV来源的核酸序列)的多核苷酸载体,其侧翼为至少一个,优选两个AAV反向末端重复序列(ITR)。当存在于已经使用适当的辅助病毒(或表达适当的辅助功能)感染并表达AAV rep和cap基因产物(即AAV Rep和Cap蛋白)的宿主细胞中时,该rAAV载体可复制并包装入感染的病毒颗粒。当rAAV载体并入较大多核苷酸(例如,在染色体中或在用于克隆或转染的另一载体如质粒中)时,可将rAAV载体称为“原载体(pro-vector)”,其在AAV包装功能和适当的辅助功能存在下可通过复制和壳体化“援救”。rAAV载体可以是多种形式中的任一种,包括但不限于质粒、线性人工染色体,其可与脂质体复合、包封在脂质体内,且在实施方案中,包封在病毒颗粒特别是AAV颗粒中。可将rAAV载体包装入AAV病毒衣壳以生成“重组腺伴随病毒颗粒(rAAV颗粒)”。AAV辅助功能(即允许AAV由宿主细胞复制和包装的功能)可以多种形式中的任一种提供,包括但不限于帮助AAV复制和包装的辅助病毒或辅助病毒基因。其他AAV辅助功能为本领域已知。

[0353] “rAAV病毒”或“rAAV病毒颗粒”指由至少一种AAV衣壳蛋白和壳体化的rAAV载体基因组组成的病毒颗粒。

[0354] “异源”意为源自与其所比较的或其所导入或并入的实体的其余部分在基因型上不同的实体。例如,由基因工程技术引入不同细胞类型的核酸是异源核酸(且当表达时,可编码异源多肽)。相似地,并入病毒载体的细胞序列(例如基因或其部分)相对于载体是异源核苷酸序列。

[0355] 术语“转基因”指引入细胞并能够转录成为RNA且任选地在适当的条件下翻译和/或表达的核酸。一些方面中,其赋予其所引入的细胞预期的特性,或除此以外导致预期的治疗或诊断结果。另一方面,其可转录成为介导RNA干扰的分子,如siRNA。

[0356] 如指代病毒滴度中使用,术语“基因组颗粒(gp)”、“基因组等价物”或“基因组拷贝”指包含重组AAV DNA基因组的病毒粒数目,不论其感染性或功能性。在特定载体制备中基因组颗粒的数目可通过如本文实施例或例如Clark等(1999)Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk等(2002)Mol. Ther., 6:272-278中所述的方法测量。

[0357] 如指代病毒滴度中使用,术语“感染单位(iu)”、“感染颗粒”或“复制单位”指如通过感染中心测定所测量的具有感染和复制能力的重组AAV载体颗粒的数目,也称为复制中心测定,如例如McLaughlin等(1988)J. Virol., 62:1963-1973中所述。

[0358] 如指代病毒滴度中使用,术语“转导单位(tu)”指导致功能性转基因产物产生的感染性重组AAV载体颗粒的数目,如在功能性测定中所测量,如本文实施例或例如Xiao等(1997)Exp. Neurobiol., 144:113-124中;或Fisher等(1996)J. Virol., 70:520-532(LFU测定)中所述。

[0359] “反向末端重复”或“ITR”序列是本领域熟知的术语且指代在病毒基因组的末端发现的相对短的序列,其处于相反方向。

[0360] “AAV反向末端重复(ITR)”序列是本领域熟知的术语,其为在天然单链AAV基因组

两末端存在的约145个核苷酸的序列。ITR的最外面125个核苷酸可以两种可替换的方向中的任一种存在,导致不同AAV基因组间和单AAV基因组的两末端间的异质性。最外面125个核苷酸还包含自身互补的数个较短区(称为A、A'、B、B'、C、C'和D区),允许在该ITR部分内发生链间碱基配对。

[0361] “末端解析序列”或“trs”是在病毒DNA复制过程中通过AAV rep蛋白切割的AAV ITR的D区中的序列。突变体末端解析序列难以通过AAV rep蛋白切割。

[0362] 对于AAV的“辅助病毒”指允许AAV(为有缺陷的细小病毒)通过宿主细胞复制并包装的病毒。已识别多种这样的辅助病毒,包括腺病毒、疱疹病毒和痘类病毒如牛痘。腺病毒涵盖多个不同的亚类,尽管亚类C的腺病毒5型(Ad5)是最常用的。已知人、非人哺乳动物和鸟类来源的多种腺病毒且可从保藏机构如ATCC获得。也可从保藏机构如ATCC获得的疱疹病毒家族包括例如单纯疱疹病毒(herpes simplex viruses,HSV)、EB病毒(Epstein-Barr viruses,EBV)、巨细胞病毒(cytomegaloviruses,CMV)和伪狂犬病病毒(pseudorabies viruses,PRV)。

[0363] 相对于参照多肽或核酸序列的“百分比(%)序列同一性”定义为对齐序列并引进缺口后(若需要,以实现最大百分比序列同一性,且不将任何保守取代考虑为序列同一性的部分),候选序列中与参照多肽或核酸序列中的氨基酸残基或核苷酸相同的氨基酸残基或核苷酸的百分比。出于确定百分比氨基酸或核酸序列同一性的目的的比对可以多种本领域内的方式实现,例如使用公共可获得的计算机软件程序,例如Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel et al.,eds.,1987),Supp.30,section 7.7.18,表7.7.1中所述的那些,且包括BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。优选的比对软件是ALIGN Plus(Scientific and Educational Software,Pennsylvania)。本领域的技术人员可确定用于测量比对的适当的参数,包括任何在比较的序列全长上需要实现最大比对的算法。就本文而言,给定氨基酸序列A对、与或针对给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(其可替换地可称为具有或包含对、与或针对给定氨基酸序列B具有一定%氨基酸序列同一性的氨基酸序列A)如下计算:100乘以分数 X/Y ,其中X是在A和B的程序比对中通过序列比对程序评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,且其中Y是B中氨基酸残基的总数。可以理解的是其中氨基酸序列A的长度与氨基酸序列B的长度不等,A对B的%氨基酸序列同一性将不等于B对A的%氨基酸序列同一性。就本文而言,给定核酸序列C对、与或针对给定核酸序列D的%核酸序列同一性(其可替换地可称为对、与或针对给定核酸序列D具有或包含一定%核酸序列同一性的给定核酸序列C)如下计算:100乘以分数 W/Z ,其中W是在C和D的程序比对中通过序列比对程序评分为相同匹配的核苷酸的数目,且其中Z是D中核苷酸的总数。可以理解的是其中核酸序列C的长度不等于核酸序列D的长度,C对D的%核酸序列同一性将不等于D对C的%核酸序列同一性。

[0364] “分离的”分子(例如核酸或蛋白)或细胞意为其已经鉴定和从其天然环境的组分分离和/或回收。

[0365] “有效量”是足以影响有益的或预期的结果,包括临床结果(例如改善症状、实现临床终点等)的量。有效量可以一次或多次施用。就疾病状态而言,有效量是足以改善、稳定或延迟疾病进展的量。例如,有效量的rAAV颗粒表达预期量的异源核酸如治疗性多肽或治疗性核酸。

[0366] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养动物(例如,牛、绵羊(sheep)、猫、狗和马)、灵长类动物(例如,人和非人灵长类动物如猴)、兔和啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。在一些实施方案中,个体或受试者是人。

[0367] 如本文使用的“治疗”是用于获得有益或预期的临床结果的方式。就本发明而言,有益或预期的临床结果包括但不限于症状改善、疾病程度的减少、疾病的稳定化(例如未恶化)状态、疾病扩散(例如转移)的防止、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善或缓和以及缓解(无论部分或全部),无论是可检测的或不可检测的。“治疗”还可意为与未接受治疗的预期生存率相比延长生存率。

[0368] 如本文使用的术语“小梁网”指位于角膜和虹膜附近的海绵样组织,其发挥功能以将房水从眼部排入血液。位于角膜和虹膜附近的海绵样组织发挥功能以将房水从眼部排入血液。小梁网包含内皮内衬空间(小梁间隙),房水穿透其至巩膜静脉窦(Schlemm's canal)。其经常分为两部分:与角膜和巩膜接触并开放进入巩膜静脉窦的角膜巩膜网和面对前房的葡萄膜小梁。

[0369] 如本文使用的术语“中央视网膜”指外黄斑和/或内黄斑和/或中央凹。如本文使用的术语“中央视网膜细胞类型”指中央视网膜的细胞类型,如例如RPE和感光细胞。

[0370] 术语“黄斑”指灵长类动物中中心视网膜的区域,其相比外周视网膜包含较高相对浓度的感光细胞,特别是视杆和视锥细胞。如本文使用的术语“外黄斑”还称为“外周黄斑”。如本文使用的术语“内黄斑”还称为“中心黄斑”。

[0371] 术语“中央凹”指灵长类动物中心视网膜中直径约等于或小于0.5mm的小区域,其相比外周视网膜和黄斑包含与较高相对浓度的感光细胞,特别是视锥细胞。

[0372] 如本文使用的术语“视网膜下间隙”指感光细胞和视网膜色素上皮细胞间视网膜中的位置。视网膜下间隙可以是潜在的空间,如任何流体视网膜下注射前。视网膜下间隙还可包含注射入潜在空间的流体。在该情况中,流体“与视网膜下间隙接触”。“与视网膜下间隙接触”的细胞包括在视网膜下间隙边界的细胞,如RPE和感光细胞。

[0373] 如本文使用的术语“泡(bleb)”指眼部视网膜下间隙内的流体空间。本发明的泡可通过将流体单次注射入单一间隙、通过将一种或多种流体多次注射入相同间隙或通过多次注射入多个间隙生成,其当重新定位时生成在视网膜下间隙的预期部分上用于实现治疗效果的总流体间隙。

[0374] “鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子”指源自鸡 β -肌动蛋白基因的多核苷酸序列(例如,原鸡(*Gallus gallus*) β 肌动蛋白,由GenBank Entrez Gene ID 396526表示)。如本文使用的“鸡 β -肌动蛋白启动子”可指包含巨细胞病毒(CMV)早期增强子元件,鸡 β -肌动蛋白基因的启动子和第一外显子和内含子,以及兔 β -珠蛋白基因的剪接受体的启动子,如Miyazaki, J.,等(1989)Gene 79(2):269-77中所述的序列。如本文使用的术语“CAG启动子”可互换使用。如本文使用的术语“CMV早期增强子/鸡 β 肌动蛋白(CAG)启动子”可互换使用。

[0375] “肌纤蛋白(MYOC)”指涉及细胞骨架功能、细胞粘附、细胞信号传导和细胞迁移的蛋白(或编码所述蛋白的基因),也由于小梁网诱导型糖皮质激素响应、GPOA、TIGR、GLC1A、JOAG和JOAG1所知。肌纤蛋白在多种不同细胞类型中作为分泌蛋白表达。在眼中,认为肌纤蛋白通过小梁网分泌进入房水,该组织在眼内压(IOP)调节中至关重要。如上文所述,认为肌纤蛋白中的突变导致原发性开角型青光眼病例亚类,特别是幼年型病症。

[0376] 如本文使用的“肌纤蛋白”可指全长的前体以及任何经加工的蛋白形式(例如,从细胞分泌的成熟蛋白)。肌纤蛋白的实例可包括但不限于人、小鼠、狗和猫肌纤蛋白,例如NCBI参考序列NP_000252、NP_034995、NP_001041495和NP_001265779。肌纤蛋白基因的实例可包括但不限于人、小鼠、狗和猫肌纤蛋白基因,例如GenBank Entrez Gene ID 4653 (MYOC,也称为GPOA、JOAG、TIGR、GLC1A和JOAG1)、GenBank Entrez Gene ID 17926(Myoc,也称为TIGR、GLC1A和AI957332)、GenBank Entrez Gene ID 490344和GenBank Entrez Gene ID 101087632。

[0377] “R-脊椎蛋白1 (RSP01)”指参与Wnt信号传导调节的R-脊椎蛋白家族成员。术语“RSP01”可指RSP01蛋白或编码RSP01蛋白的基因。含有血小板反应素1型重复 (TSR-1) 的蛋白R-脊椎蛋白的超家族成员包括信号肽、TSR-1结构域和两个弗林蛋白酶样重复。尽管精确的机制尚不清楚,认为R-脊椎蛋白家族多肽活化Wnt信号传导。对于R-脊椎蛋白和Wnt信号传导间关联的进一步描述,参见例如Kim, K.A.等(2006) *Cell Cycle* 5:23-26; Kim, K.A.等(2008) *Mol. Biol. Cell*. 19:2588-2596; Jin, Y.R. and Yoon, J.K. (2012) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44:2278-2287; 和de Lau, W.B.,等(2012) *Genome Biol.* 13(3): 242。

[0378] 如本文使用,“RSP01”可指全长的前体以及任何经加工形式的蛋白(例如从细胞分泌的成熟蛋白)。RSP01蛋白的实例可包括但不限于人、小鼠、狗和猫RSP01,例如NCBI参考序列NP_001229837、NP_619624、XP_00562890和XP_003989918。RSP01基因的实例可包括但不限于人、小鼠、狗和猫RSP01基因,例如GenBank Entrez Gene ID 284654 (RSP01,也称为RSP0和CRISTIN3)、GenBank Entrez Gene ID 192199 (Rspo1,也称为R脊椎蛋白和R-脊椎蛋白)、GenBank Entrez Gene ID 608179和GenBank Entrez Gene ID 101091033。在一些实施方案中,RSP01是RSP01的功能性变体。在一些实施方案中,功能性RSP01变体可包含一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失(例如截短)但保留对应全长RSP01的一种或多种活性的一些或全部活性(例如,Wnt信号传导活性,其测定在本文描述或例证)。在一些实施方案中,功能性RSP01变体是截短的RSP01。截短的RSP01多肽的实例包括但不限于SEQ ID NO:11和12,或缺失信号肽的加工形式的SEQ ID NO:11和12。

[0379] “R-脊椎蛋白2 (RSP02)”指涉及Wnt信号传导调节的R-脊椎蛋白家族成员。术语“RSP02”可指RSP02蛋白或编码RSP02蛋白的基因。含有血小板反应素1型重复 (TSR-1) 的蛋白R-脊椎蛋白的超家族成员包括信号肽、TSR-1结构域和两个弗林蛋白酶样重复。尽管精确的机制尚不清楚,认为R-脊椎蛋白家族多肽活化Wnt信号传导。对于R-脊椎蛋白和Wnt信号传导间关联的进一步描述,参见例如Kim, K.A.等(2006) *Cell Cycle* 5:23-26; Kim, K.A.等(2008) *Mol. Biol. Cell*. 19:2588-2596; Jin, Y.R. and Yoon, J.K. (2012) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44:2278-2287; 和de Lau, W.B.,等(2012) *Genome Biol.* 13(3): 242。

[0380] 如本文使用的“RSP02”可指全长的前体以及任何加工形式的蛋白(例如分泌自细胞的成熟蛋白)。RSP02蛋白的实例可包括但不限于人、小鼠、狗和猫RSP02,例如NCBI参考序列NP_848660、NP_766403、XP_005627927和XP_004000104。RSP02基因的实例可包括但不限于人、小鼠、狗和猫RSP02基因,例如GenBank Entrez Gene ID 340419 (RSP02,也称为CRISTIN2)、GenBank Entrez Gene ID 239405 (Rspo2,也称为ft1s、AA673245、D430027K22

和2610028F08Rik)、GenBank Entrez Gene ID 482004和GenBank Entrez Gene ID 101087380。在一些实施方案中,RSP02是RSP02的功能性变体。在一些实施方案中,功能性RSP02变体可包含一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失(例如截短)但保留对应全长RSP02的一种或多种活性的一些或全部活性(例如,Wnt信号传导活性,其测定在本文描述或例证)。在一些实施方案中,功能性RSP02变体是截短的RSP02。截短的RSP02多肽的实例包括但不限于SEQ ID NO:13和14,或缺失信号肽的加工形式的SEQ ID NO:13和14。

[0381] “R-脊椎蛋白3 (RSP03)”指参与Wnt信号传导调节的R-脊椎蛋白家族成员。术语“RSP03”可指RSP03蛋白或编码RSP03蛋白的基因。含有血小板反应素1型重复 (TSR-1) 的蛋白R-脊椎蛋白的超家族成员包括信号肽、TSR-1结构域和两个弗林蛋白酶样重复。尽管精确的机制尚不清楚,认为RSP03活化Wnt信号传导,且小鼠和非洲爪蟾 (*Xenopus*) 中RSP03功能的丧失导致Wnt功能丧失表型 (Kazanskaya, O., 等 (2008) *Development* 135:3655-64)。对于R-脊椎蛋白和Wnt信号传导间关联的进一步描述,参见例如de Lau, W.B., 等 (2012) *Genome Biol.* 13(3):242。

[0382] 如本文使用,“RSP03”可指全长的前体以及任何加工形式的蛋白(例如来自细胞的成熟蛋白)。RSP03蛋白的实例可包括但不限于人、小鼠、狗和猫RSP03,例如NCBI参考序列NP_116173、NP_082627、XP_005615677和XP_003986583。RSP03基因的实例可包括但不限于人、小鼠、狗和猫RSP03基因,例如GenBank Entrez Gene ID 84870 (RSP03,也称为PWTSR、THSD2和CRISTIN1)、GenBank Entrez Gene ID 72780 (Rspo3,也称为Thsd2、Cristin1、AW742308和2810459H04Rik)、GenBank Entrez Gene ID 476287和GenBank Entrez Gene ID 101085635。在一些实施方案中,RSP03是RSP03的功能性变体。在一些实施方案中,功能性RSP03变体可包括一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失(例如截短)但保留对应全长RSP03的一种或多种活性的一些或全部活性(例如,Wnt信号传导活性,其测定在本文描述和/或例证)。在一些实施方案中,功能性RSP03变体是截短的RSP03。截短的RSP03多肽的实例包括但不限于SEQ ID NO:15-17或缺少信号肽的加工形式的SEQ ID NO:15-17。

[0383] “R-脊椎蛋白4 (RSP04)”指参与Wnt信号传导调节的R-脊椎蛋白家族成员。术语“RSP04”可指RSP04蛋白或编码RSP04蛋白的基因。含有血小板反应素1型重复 (TSR-1) 的蛋白R-脊椎蛋白的超家族成员包括信号肽、TSR-1结构域和两个弗林蛋白酶样重复。尽管精确的机制尚不清楚,认为R-脊椎蛋白家族多肽活化Wnt信号传导。对于R-脊椎蛋白和Wnt信号传导间关联的进一步描述,参见例如Kim, K.A. 等 (2006) *Cell Cycle* 5:23-26; Kim, K.A. 等 (2008) *Mol. Biol. Cell.* 19:2588-2596; Jin, Y.R. and Yoon, J.K. (2012) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44:2278-2287; 和de Lau, W.B., 等 (2012) *Genome Biol.* 13(3):242。

[0384] 如本文使用,“RSP04”可指全长的前体以及任何加工形式的蛋白(例如分泌自细胞的成熟蛋白)。RSP04蛋白的实例可包括但不限于人、小鼠、狗和猫RSP04,例如NCBI参考序列NP_001025042、NP_001035779、XP_542937和XP_011279253。RSP04基因的实例可包括但不限于人、小鼠、狗和猫RSP04基因,例如GenBank Entrez Gene ID 343637 (RSP04,也称为CRISTIN4和C20orf182)、GenBank Entrez Gene ID 228770 (Rspo4,也称为A730099F22和A930029K19Rik)、GenBank Entrez Gene ID 485813和GenBank Entrez Gene ID 101091527。在一些实施方案中,RSP04是RSP04的功能性变体。在一些实施方案中,功能性

RSP04变体可包含一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失(例如截短)但保留对应全长RSP04的一种或多种活性的一些或全部活性(例如,Wnt信号传导活性,其测定在本文描述或例证)。在一些实施方案中,功能性RSP04变体是截短的RSP04。截短的RSP04多肽的实例包括但不限于SEQ ID NO:18和19,或缺少信号肽的加工形式的SEQ ID NO:18和19。

[0385] 如本文使用,“RNA干扰(RNAi)”是其中RNA分子抑制基因表达(通常通过引起特定mRNA分子的破坏)的生物过程。RNAi的实例包括小抑制性RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)、小发夹RNA(shRNA)。

[0386] 如本文使用,“小发夹RNA”或“短发夹RNA”(shRNA)是产生能够用于沉默靶基因表达(例如通过RNA干扰)的紧固发夹回转结构(tight hairpin turn)的RNA分子。

[0387] “Wnt信号传导”指通过Wnt蛋白和卷曲(Frizzled,Fz)家族受体间的相互作用调节的相关细胞信号传导通路的集合(综述参考例如Logan,C.Y.,and Nusse,R.(2004)Annu.Rev.Cell Dev.Biol.20:781-810)。这些通路参与各种各样的发育和致病过程。如本文使用,除非另外表明,术语“Wnt信号传导”可指典型Wnt通路的部分或全部,Wnt/平面细胞极性(planar cell polarity,PCP)通路和/或Wnt/钙通路。例如,在典型的Wnt通路中,Wnt与卷曲(Frizzled)/LRP受体复合物的结合导致Dishevelled(Dsh)、Axin、结肠腺瘤性息肉(Adenomatous Polyposis Coli,APC)和糖原合酶激酶(GSK-3)活性的调节,最终抑制β-连环蛋白的降解。β-连环蛋白随后能够转运至核并调节基因转录,例如,结合淋巴增强子结合因子1/T细胞特异性转录因子(LEF/TCF)转录因子。在一些实施方案中,可测定β-连环蛋白活性作为Wnt信号传导的读出(例如通过TOP-Flash测定,如Molenaar,M.,等(1996)Cell 86(3):391-9中所表征)。

[0388] 本文提及“约”某个值或参数包括(和描述)针对值或参数本身的实施方案。例如,提及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0389] 如本文使用,除非另外表明,单数形式的冠词“一种”、“一个”和“所述”包括复数指代物。

[0390] 应该理解的是,本文所述的本发明的方面和实施方案包括“包含”、“由…组成”和/或“基本上由…组成”的方面和实施方案。

[0391] III. 治疗方法

[0392] 本发明提供用于肌纤蛋白(MYOC)青光眼的基因疗法的方法,其中将包含治疗载体的rAAV颗粒递送至哺乳动物的眼部。在一些实施方案中,肌纤蛋白(MYOC)青光眼是原发性开角型青光眼(POAC)。在一些实施方案中,肌纤蛋白(MYOC)青光眼是幼年型原发性开角型青光眼(JOAC)。在一些实施方案中,哺乳动物是人(例如具有POAC的人或具有JOAC的人)。在一些实施方案中,具有肌纤蛋白(MYOC)青光眼的哺乳动物具有突变的MYOC。在一些实施方案中,突变的MYOC包含对应人MYOC的E323K、K398R、Q368X、G364V、P370L、D380A、K423E、Y437H和I477S的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中,突变的MYOC基因包含对应人MYOC的P370L和/或Y437H氨基酸取代的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中,本发明提供在人中治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的方法,包括对所述人的眼部施用有效量的rAAV颗粒,所述颗粒含有编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体和/或MYOC RNAi(例如shRNA)的载体。在一些实施方案中,本发明的方法用于减少哺乳动物中肌纤蛋白(MYOC)青光眼的症状;例如,减少眼内压、减少小梁网中MYOC的积累、减少眼高压或增加来自小梁网

的房水外流。

[0393] 一些方面,本发明提供在具有眼部病症的哺乳动物中增强小梁网细胞中Wnt信号传导的方法,包括对所述哺乳动物的眼部施用重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,所述颗粒包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的载体。在一些实施方案中,本发明提供在具有眼部病症的哺乳动物中增强小梁网细胞中Wnt信号传导的方法,包括对所述哺乳动物的眼部施用重组腺伴随病毒(rAAV)颗粒,所述颗粒包含编码靶向哺乳动物中肌纤蛋白(MYOC)表达的MYOC RNAi的载体。在一些实施方案中,Wnt信号传导使用表达RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体和/或MYOC RNAi的一种或多种病毒颗粒增强;例如,RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体和MYOC RNAi可从具有不同重组病毒基因组或从相同的rAAV病毒基因组表达。

[0394] 治疗性载体

[0395] 本发明提供用于肌纤蛋白(MYOC)青光眼的基因疗法的方法,其中将包含治疗性载体的rAAV颗粒递送至哺乳动物的眼部;例如,治疗性载体可编码治疗性核酸和/或治疗性多肽。编码治疗性核酸和/或治疗性多肽的治疗性AAV载体可使用本领域已知的方法、使用标准合成和重组方法生成。在一些实施方案中,治疗性多肽是刺激Wnt信号传导的多肽。在一些实施方案中,突变体MYOC存在下治疗性多肽刺激Wnt信号传导。在一些实施方案中,人突变体MYOC存在下治疗性多肽刺激Wnt信号传导。在一些实施方案中,与青光眼相关的人突变体MYOC存在下治疗性多肽刺激Wnt信号传导。在一些实施方案中,突变体MYOC包含P370L和/或Y437H氨基酸取代。在一些实施方案中,突变的MYOC包含对应人MYOC的E323K、K398R、Q368X、G364V、P370L、D380A、K423E、Y437H和I477S的一个或多个氨基酸取代。

[0396] 在一些实施方案中,本发明提供用于治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的rAAV载体,其中所述rAAV载体编码R-脊椎蛋白(RSPO)多肽(例如RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体)。在一些实施方案中,RSP01多肽是人RSP01。在一些实施方案中,RSP01包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其功能性变体。RSP01功能性变体的实例包括具有一个或多个氨基酸取代、添加和/或缺失的SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,变体RSP01包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10个取代、添加和/或缺失的SEQ ID NO:8的氨基酸序列,同时维持刺激Wnt信号传导的能力(例如,突变体MYOC存在下)。在一些实施方案中,变体RSP01与SEQ ID NO:8具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP01是截短的RSP01。在一些实施方案中,截短的RSP01可包含一个或多个弗林蛋白酶样富含Cys结构域(例如FU1和/或FU2)但缺少下述中的一个或多个:信号肽、血小板反应素1型结构域(例如TSR-1或TSP1)和/或带正电荷的C-末端结构域(例如包含二分NLS和/或BR结构域;例如参见图11-13C)。在一些实施方案中,截短的RSP01可包含SEQ ID NO:11和/或12或缺少信号肽的加工形式的SEQ ID NO:11和/或12。在一些实施方案中,截短的RSP01与SEQ ID NO:11和/或12具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP02多肽是人RSP02。在一些实施方案中,RSP02包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或其功能性变体。RSP02功能性变体的实例包括具有一个或多个氨基酸取代、添加和/或缺失的SEQ ID NO:9的氨基酸序列的RSP02。在一些实施方案中,变体RSP02包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10个取代、添加和/或缺失的SEQ ID NO:9的氨基酸序列,同时维持刺激Wnt信号传导的能力(例如,

突变体MYOC存在下)。在一些实施方案中,变体RSP02与SEQ ID NO:9具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP02是截短的RSP02。在一些实施方案中,截短的RSP02可包含一个或多个弗林蛋白酶样富含Cys结构域(例如FU1和/或FU2)但缺少下述中的一个或多个:信号肽、血小板反应素1型结构域(例如TSR-1或TSP1)和/或带正电荷的C-末端结构域(例如包含二分NLS和/或BR结构域;以供参考参见图11-13C)。在一些实施方案中,截短的RSP02可包含SEQ ID NO:13和/或14,或缺少信号肽的加工形式的SEQ ID NO:13和/或14。在一些实施方案中,截短的RSP02与SEQ ID NO:13和/或14具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP03多肽是人RSP03。在一些实施方案中,RSP03包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其功能性变体。RSP03功能性变体的实例包括具有一个或多个氨基酸取代、添加和/或缺失的SEQ ID NO:1的氨基酸序列的RSP03。在一些实施方案中,变体RSP03包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10个取代、添加和/或缺失的SEQ ID NO:1的氨基酸序列,同时维持刺激Wnt信号传导的能力(例如,突变体MYOC存在下)。在一些实施方案中,变体RSP03与SEQ ID NO:1具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP03是截短的RSP03。在一些实施方案中,截短的RSP03可包含一个或多个弗林蛋白酶样富含Cys结构域(例如FU1和/或FU2)但缺少下述中的一个或多个:信号肽、血小板反应素1型结构域(例如TSR-1或TSP1)和/或带正电荷的C-末端结构域(例如包含二分NLS和/或BR结构域;例如参见图11-13C)。在一些实施方案中,截短的RSP03可包含SEQ ID NO:15、16和/或17或缺少信号肽的加工形式的SEQ ID NO:15、16和/或17。在一些实施方案中,截短的RSP03与SEQ ID NO:15、16和/或17具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP04多肽是人RSP04。在一些实施方案中,RSP04包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或其功能性变体。RSP04功能性变体的实例包括具有一个或多个氨基酸取代、添加和/或缺失的SEQ ID NO:10的氨基酸序列的RSP04。在一些实施方案中,变体RSP04包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10个取代、添加和/或缺失的SEQ ID NO:10的氨基酸序列,同时维持刺激Wnt信号传导的能力(例如,突变体MYOC存在下)。在一些实施方案中,变体RSP04与SEQ ID NO:10具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,RSP04是截短的RSP04。在一些实施方案中,截短的RSP04可包含一个或多个弗林蛋白酶样富含Cys结构域(例如FU1和/或FU2)但缺少下述中的一个或多个:信号肽、血小板反应素1型结构域(例如TSR-1或TSP1)和/或带正电荷的C-末端结构域(例如包含二分NLS和/或BR结构域;例如参见图11-13C)。在一些实施方案中,截短的RSP04可包含SEQ ID NO:18和/或19或缺少信号肽的加工形式的SEQ ID NO:18和19。在一些实施方案中,截短的RSP04与SEQ ID NO:18和/或19具有大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。

[0397] 在一些实施方案中,rAAV载体包含与启动子可操作连接的编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的核酸。在一些实施方案中,启动子能够在哺乳动物眼中表达RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体。在一些实施方案中,启动子能够在小梁网的细胞中表达RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体。在一些实施方案中,启动子是杂交鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子。

[0398] 本发明提供用于肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的基因疗法的方法, 其中将包含治疗性载体的rAAV颗粒递送至哺乳动物的眼部; 例如治疗性载体可编码治疗性核酸和/或治疗性多肽。编码治疗性核酸和/或治疗性多肽的治疗性AAV载体可使用本领域已知的方法、使用标准的合成和重组方法生成。在一些实施方案中, 治疗性核酸编码靶向MYOC的表达的RNA。在一些实施方案中, 异源核酸编码减少或抑制MYOC的表达的RNA。在一些实施方案中, 异源核酸编码减少或抑制突变体MYOC的表达的RNA。在一些实施方案中, 异源核酸编码减少或抑制突变体人MYOC的表达的RNA。在一些实施方案中, 突变体人MYOC包含P370L氨基酸取代和/或Y437氨基酸取代。治疗性核酸的非限制性实例包括RNAi、小抑制性RNA (siRNA)、微小RNA (miRNA)、小发夹RNA (shRNA) 和/或核酶 (如锤头和发夹核酶)。在一些实施方案中, 编码减少或抑制MYOC的表达的RNA的异源核酸是减少或抑制MYOC的表达的shRNA (例如野生型和突变体MYOC)。

[0399] 一些方面, 本发明提供用于肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的基因疗法的方法, 其中将包含治疗性载体的rAAV颗粒递送至哺乳动物的眼部, 其中所述载体包含编码一种或多种治疗性多肽的核酸。包含治疗性载体的rAAV颗粒可使用本领域已知的方法、使用标准合成和重组方法生成。在一些实施方案中, 载体编码治疗性多肽。在一些实施方案中, 治疗性多肽靶向Wnt信号传导。在一些实施方案中, 治疗性多肽刺激Wnt信号传导。

[0400] 一些方面, 本发明提供用于肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的基因疗法的方法, 其中将包含治疗性载体的rAAV颗粒递送至哺乳动物的眼部, 其中所述载体包含编码一种或多种治疗性多肽和一种或多种治疗性核酸的核酸。包含治疗性载体的rAAV颗粒可使用本领域已知的方法、使用标准合成和重组方法生成。在一些实施方案中, 治疗性多肽靶向Wnt信号传导且治疗性核酸靶向MYOC表达。在一些实施方案中, 治疗性多肽刺激Wnt信号传导。在一些实施方案中, 异源核酸编码减少或抑制MYOC的表达的RNA。在一些实施方案中, 异源核酸编码减少或抑制突变体MYOC表达的RNA。在一些实施方案中, 异源核酸编码减少或抑制突变体人MYOC的表达的RNA。在一些实施方案中, 突变体人MYOC包含P370L氨基酸取代和/或Y437氨基酸取代。治疗性核酸的非限制性实例包括RNAi、siRNA、miRNA、shRNA和/或核酶。

[0401] 一些方面, 本发明提供在哺乳动物中用于肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的基因疗法的方法, 其中将包含编码一种或多种治疗性多肽的载体的rAAV颗粒施用至哺乳动物并将包含编码一种或多种治疗性核酸的载体的rAAV颗粒施用至哺乳动物。在一些实施方案中, 治疗性多肽靶向Wnt信号传导且治疗性核酸靶向MYOC表达。在一些实施方案中, 治疗性多肽刺激Wnt信号传导。在一些实施方案中, 异源核酸编码减少或抑制MYOC的表达的RNA。在一些实施方案中, 异源核酸编码减少或抑制突变体MYOC的表达的RNA。在一些实施方案中, 异源核酸编码减少或抑制突变体人MYOC的表达的RNA。在一些实施方案中, 突变体人MYOC包含P370L氨基酸取代和/或Y437氨基酸取代。治疗性核酸的非限制性实例包括RNAi、siRNA、miRNA、shRNA和/或核酶。可将包含编码一种或多种治疗性多肽的载体的rAAV颗粒和包含编码一种或多种治疗性核酸的载体的rAAV颗粒同时或顺序施用至哺乳动物。在一些实施方案中, 在施用包含编码一种或多种治疗性核酸的载体的rAAV颗粒前施用包含编码一种或多种治疗性多肽的载体的rAAV颗粒。在一些实施方案中, 在施用包含编码一种或多种治疗性核酸的载体的rAAV颗粒后施用包含编码一种或多种治疗性多肽的载体的rAAV颗粒。

[0402] 本发明的核酸可编码为细胞内蛋白、锚定在细胞膜中、保留在细胞内或使用本发

明的载体转导的由细胞分泌的多肽。对于由接受载体的细胞分泌的多肽；优选所述多肽是可溶的（即不附着至细胞）。例如，可溶多肽缺少跨膜区且由细胞分泌。鉴定和去除编码跨膜结构域的核酸序列的技术为本领域已知。

[0403] 根据本发明可施用的载体还包括含有编码RNA（例如shRNA、RNAi、核酶、miRNA、siRNA、反义RNA）的核酸的载体，当由载体的核酸转录时所述RNA可通过干扰与本发明的疾病状态相关的异常或过量蛋白例如MYOC的翻译或转录治疗肌纤蛋白（MYOC）青光眼。在一些实例中，本发明的核酸可编码RNA，其通过高度特异性消除或减少编码异常和/或过量蛋白的mRNA治疗疾病。治疗性RNA序列包括小发夹RNA（shRNA）、RNAi、小抑制性RNA（siRNA）、微小RNA（miRNA）和/或核酶（如锤头和发夹核酶），其可通过高度特异性消除或减少编码异常和/或过量蛋白的mRNA治疗疾病，所述蛋白如在多种形式的遗传性视网膜变性中发生的那些。可用于本发明的治疗性RNA序列和编码这些序列的核酸的实例包括描述于例如美国专利号6,225,291中的那些，其内容在本文通过提述以其全文并入。

[0404] 在本发明的一些实施方案中，治疗性RNA序列是靶向MYOC的表达的RNAi（例如shRNA）序列。在一些实施方案中，靶向MYOC的表达的RNAi（例如shRNA）序列是减少或抑制MYOC的表达的RNAi（例如shRNA）序列。在一些实施方案中，RNAi（例如shRNA）减少或抑制人MYOC的表达。在一些实施方案中，RNAi（例如shRNA）减少或抑制包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的MYOC的表达。在一些实施方案中，MYOC RNAi（例如shRNA）靶向MYOC的QAMSVIH（SEQ ID NO:6）氨基酸序列。在一些实施方案中，rAAV颗粒编码包含多于一种靶向MYOC的表达（例如减少或抑制）的RNAi的载体。在一些实施方案中，MYOC RNAi（例如shRNA）的环序列包含核酸序列AATAGTGAAGCCACAGATGTATT（SEQ ID NO:7）。在一些实施方案中，rAAV颗粒编码包含靶向MYOC的表达（例如减少或抑制）的1、2、3、4、5或更多种RNAi（例如，shRNA）的载体。

[0405] 在一些实施方案中，rAAV载体包含与启动子可操作连接的编码MYOC RNAi（例如shRNA）的核酸。在一些实施方案中，启动子能够在哺乳动物的眼中表达MYOC RNAi（例如shRNA）。在一些实施方案中，启动子能够在小梁网的细胞中表达MYOC RNAi（例如shRNA）。在一些实施方案中，启动子是杂交鸡 β -肌动蛋白（CBA）启动子。在一些实施方案中，启动子是RNA聚合酶III启动子。

[0406] 在一些实施方案中，rAAV载体包含编码如本文所述的任何RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的核酸和编码任何如本文所述的MYOC RNAi（例如shRNA）的核酸。在一些实施方案中，编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的核酸和编码MYOC RNAi（例如shRNA）的核酸在不同的rAAV基因组上。在一些实施方案中，编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的核酸和编码MYOC RNAi（例如shRNA）的核酸在相同的rAAV基因组上。在一些实施方案中，编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的核酸和编码MYOC RNAi（例如shRNA）的核酸与相同的启动子可操作连接。在一些实施方案中，编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的核酸和编码MYOC RNAi（例如shRNA）的核酸与不同的启动子可操作连接。在一些实施方案中，编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的核酸在编码MYOC RNAi（例如shRNA）的核酸的5'。在一些实施方案中，编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的核酸在编码MYOC RNAi（例如shRNA）的核酸的3'。在一些实施方案中，编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的核酸和编码MYOC RNAi（例如shRNA）的核酸与相同的启动子可操作连接，其中所述核酸在RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或

其功能性变体和MYOC RNAi (例如shRNA) 核酸间包含内部核糖体进入位点(IRES)。

[0407] rAAV组合物

[0408] 一些方面,本发明提供含有任何本文所述的rAAV颗粒的组合物。一般而言,用于在本发明的方法和系统中使用的组合物包含有效量的含有编码多肽和/或RNA的rAAV载体的rAAV颗粒,优选在药物上可接受的赋形剂中。如本领域熟知,药物上可接受的赋形剂是相对惰性的物质,其促进药理学上有效的物质的施用,且可作为液体溶液或悬浮液、作为乳液或作为适于在使用前于液体中溶解或悬浮的固体形式提供。例如,赋形剂可给予形状或稠度,或作为稀释剂发挥作用。适当的赋形剂包括但不限于稳定剂、润湿和乳化剂、用于改变渗透压的盐、封装剂、pH缓冲物质和缓冲剂。这样的赋形剂包括任何适于直接递送至眼部的药剂,对其施用将不具有过度毒性。药物上可接受的赋形剂包括但不限于山梨醇、多种吐温化合物的任一种和液体如水、盐水、甘油和乙醇。药物上可接受的盐可包括其中,例如,无机酸盐如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等;和有机酸的盐如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。药物上可接受的赋形剂的深入讨论可在REMINGTON' SPHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub.Co., N.J.1991)中获得。

[0409] 一般而言,这些化合物经配制用于通过眼部注射的施用(例如玻璃体内、房内、视网膜下)。因此,这些组合物优选与药物上可接受的媒剂如盐水、林格平衡盐溶液(Ringer' s balanced salt solution,pH 7.4)等组合。尽管不需要,但组合物可任选以适于精确量施用的单位剂型提供。

[0410] 在一些实施方案中,本发明提供用于治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的rAAV的药物制剂。在一些实施方案中,所述制剂包含含有编码RSP01、RSP02、RSP03和/或RSP04多肽或其功能性变体的rAAV载体的rAAV颗粒。在一些实施方案中,所述制剂包含含有编码MYOC RNAi (例如shRNA)的rAAV载体的rAAV颗粒。在一些实施方案中,所述制剂包含含有编码RSP01、RSP02、RSP03和/或RSP04多肽或其功能性变体和MYOC RNAi (例如shRNA)的rAAV载体的rAAV颗粒。在一些实施方案中,所述制剂包含含有编码RSP01、RSP02、RSP03和/或RSP04多肽或其功能性变体的rAAV载体的rAAV颗粒和含有编码MYOC RNAi (例如shRNA)的rAAV载体的rAAV颗粒。

[0411] rAAV眼部递送的方法

[0412] 一些方面,本发明提供在哺乳动物中治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的方法,其包括将rAAV颗粒施用至哺乳动物的眼部。在一些实施方案中,rAAV颗粒包含编码RSP01、RSP02、RSP03和/或RSP04多肽或其功能性变体的rAAV载体和/或编码MYOC RNAi (例如shRNA)的rAAV载体。在一些实施方案中,将rAAV颗粒通过玻璃体内和/或房内注射递送至眼部。将rAAV颗粒施用至眼部的方法为本领域已知。

[0413] 在一些实施方案中,将包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体和/或MYOC RNAi (例如shRNA)的rAAV载体的rAAV颗粒递送至哺乳动物的眼部,其中RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体和/或MYOC RNAi (例如shRNA)在眼部小梁网中表达。在一些实施方案中,将包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体的rAAV载体的rAAV颗粒递送至其中眼部的其他部分被转导的哺乳动物的眼部(例如视网膜神经节细胞)。包含含有R471A氨基酸取代的AAV2衣壳的rAAV颗粒的使用可促进小梁网的细胞的转导。

[0414] 通过使用包含治疗性多肽或核酸序列的载体安全和有效地转导眼部细胞(例如小

梁网的细胞),本发明的方法可用于治疗具有肌纤蛋白(MYOC)青光眼的个体例如人,其中转导的细胞足以治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼(例如POAC或JOAC)的量产生治疗性多肽或RNA序列。在一些实施方案中,眼部细胞的转导通过使用含有AAV衣壳蛋白的R471A氨基酸取代(其基于AAV2的VP1编号)的rAAV2颗粒改进。在一些实施方案中,rAAV颗粒证实增加的小梁网的细胞转导;例如大于约10%、25%、50%、75%、100%或其间任何数值的小梁网的细胞的转导。

[0415] 取决于治疗目的,施用有效量的rAAV(在一些实施方案中以颗粒的形式)。例如,其中低转导百分比可实现预期的治疗效果,随后治疗目的一般满足或超过该转导水平。在一些情况中,该转导水平可通过转导仅约1-5%的靶细胞(例如小梁网的细胞)实现,在一些实施方案中,至少约20%预期组织类型的细胞,在一些实施方案中,至少约50%,在一些实施方案中,至少约80%,在一些实施方案中至少约95%,在一些实施方案中至少约99%的预期组织类型的细胞。作为指导,每次注射施用的颗粒数目一般为约 1×10^6 至约 1×10^{14} 颗粒间、约 1×10^7 至约 1×10^{13} 颗粒间、约 1×10^9 至约 1×10^{12} 颗粒间或约 1×10^9 颗粒、约 1×10^{10} 颗粒或约 1×10^{11} 颗粒。rAAV组合物可通过一次或多次眼部注射施用,在相同的操作过程中或按天、周、月或年间隔开。在一些实施方案中,可使用多种载体以治疗人。

[0416] 鉴别由AAV病毒颗粒转导的眼部细胞的方法为本领域已知;例如,免疫组化或标记物如增强的绿色荧光蛋白的使用可用于检测病毒颗粒的转导;例如包含具有一个或多个氨基酸取代的rAAV衣壳的病毒颗粒。

[0417] 在本发明的一些实施方案中,所述方法包括玻璃体内和/或房内施用有效量的AAV病毒颗粒至哺乳动物用于治疗具有肌纤蛋白(MYOC)青光眼的个体;例如具有POAC或JOAC的人。在一些实施方案中,将组合物注射至眼中的一个或多个位置以允许异源核酸在眼部细胞(例如小梁网的细胞)中的表达。在一些实施方案中,将组合物注射入眼中1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10处位置的任一种。

[0418] 在一些实施方案中,将包含rAAV衣壳的rAAV病毒颗粒同时或顺序施用至多于一处的位置。在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒的多次注射间隔不超过1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、9小时、12小时或24小时。

[0419] 视网膜下递送方法

[0420] 视网膜下递送的方法为本领域已知。例如,参见WO 2009/105690,其通过提述并入本文。简言之,用于递送rAAV颗粒(例如rAAV2颗粒)至黄斑和中央凹的视网膜下的一般方法可通过以下简要概述说明。该实例仅意在说明该方法的一些特征,而并非意在限制。

[0421] 一般而言,rAAV载体可以组合物的形式使用手术显微镜在直接观察下通过眼内注射(视网膜下)递送。在一些实施方案中,载体封装在rAAV颗粒中,其中所述rAAV颗粒包含含有rAAV衣壳蛋白的rAAV衣壳,所述rAAV衣壳蛋白在一个或多个与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖相互作用的位置包含一个或多个氨基酸取代(例如,减少或抑制或去除HSPG结合),且rAAV载体包含异源核酸和至少一个AAV反向末端重复。该过程可涉及玻璃体切除术,随后通过一个或多个小视网膜切开术使用精细套管注射rAAV载体悬浮液进入视网膜下间隙。

[0422] 简言之,整个操作过程中输液套管可缝合到位以通过输液(例如盐水)维持正常的球体积。玻璃体切除术使用适当孔径(例如20-27计)的套管实施,其中去除的玻璃体凝胶的体积由来自输液套管的盐水或其他等渗溶液的输液替换。玻璃体切除术的实施具有的优势

在于(1)其皮层(后玻璃体膜)的去除通过套管促进视网膜渗透;(2)其去除和以流体(例如盐水)替换生成空间以容纳载体的眼内注射,和(3)其受控的去除减少视网膜撕裂和意外的视网膜脱落的可能性。

[0423] 在一些实施方案中,通过利用适当孔径(例如27-45计)的套管,rAAV组合物直接注射入中心视网膜外的视网膜下间隙,因此在视网膜下间隙中生成泡。在其他实施方案中,rAAV组合物的视网膜下注射通过将小体积(例如约0.1至约0.5ml)的适当流体(如盐水或林格氏溶液)视网膜下注射入中心视网膜外的视网膜下间隙进行。向视网膜下间隙内的该初始注射在视网膜下间隙内建立了初始流体泡,导致在初始泡位置处的局部视网膜脱落。该初始流体泡可促进rAAV组合物向视网膜下间隙的靶向递送(通过在rAAV递送前限定注射的平面),并最小化进入脉络膜的可能的rAAV施用和rAAV注射或回流进入玻璃体腔的可能性。在一些实施方案中,该初始流体泡可进一步用包含一种或多种rAAV组合物和/或一种或多种其他治疗剂的流体通过以相同或额外的细孔套管将这些流体直接施用至初始流体泡注射。

[0424] rAAV组合物和/或初始的小体积流体的眼内施用可使用衔接至注射器的细孔套管(例如27-45计)实施。在一些实施方案中,该注射器的柱塞可通过机械装置驱动,如通过脚踏板的下压。在每个受试者中根据待靶向的视网膜区(但在中心视网膜外),细孔套管通过硬皮切开术推进,通过玻璃体腔并在预先确定的位点进入视网膜。在直接观察下,载体悬浮液在神经感觉视网膜下机械注射,导致使用自密封不扩张视网膜切开术的局部视网膜脱离。如上所述,rAAV组合物可直接注射入视网膜下间隙,在中心视网膜外生成泡或载体可注射入中心视网膜外的初始泡,使其扩张(并扩张视网膜脱离区)。在一些实施方案中,rAAV组合物注射后将另一流体注射入泡。

[0425] 不希望受理论所限,视网膜下注射的速率和位置可导致可损伤黄斑、中央凹和/或潜在的RPE细胞的局部剪切力。视网膜下注射可以最小化或避免剪切力的速率实施。在一些实施方案中,rAAV组合物经约15-17分钟注射。在一些实施方案中,载体经约17-20分钟注射。在一些实施方案中,rAAV组合物经约20-22分钟注射。在一些实施方案中,rAAV组合物以约35至约65 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速率注射。在一些实施方案中,rAAV组合物以约35 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速率注射。在一些实施方案中,rAAV组合物以约40 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速率注射。在一些实施方案中,rAAV组合物以约45 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速率注射。在一些实施方案中,rAAV组合物以约50 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速率注射。在一些实施方案中,rAAV组合物以约55 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速率注射。在一些实施方案中,rAAV组合物以约60 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速率注射。在一些实施方案中,rAAV组合物以约65 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速率注射。本领域的普通技术人员将认可泡的注射速率和时间可由下述指导:例如rAAV组合物的体积或生产足够的视网膜脱离以接近中心视网膜的细胞的泡的大小、用于递送rAAV组合物的套管的大小和安全保持本发明的套管位置的能力。

[0426] 在本发明的一些实施方案中,注射至视网膜的视网膜下间隙的组合物的体积大于约1 μl 、2 μl 、3 μl 、4 μl 、5 μl 、6 μl 、7 μl 、8 μl 、9 μl 、10 μl 、15 μl 、20 μl 、25 μl 、50 μl 、75 μl 、100 μl 、200 μl 、300 μl 、400 μl 、500 μl 、600 μl 、700 μl 、800 μl 、900 μl 或1mL的任一种或其间任何量。

[0427] 可生成一个或多个(例如2、3或多个)泡。一般而言,由本发明的方法和系统生成的泡的总体积不能超过眼部的流体体积,例如在典型的人受试者中为约4ml。每个单独的泡的总体积优选为至少约0.3ml,且更优选为至少约0.5ml进而促进足够大小的视网膜脱落以暴

露中心视网膜的细胞类型并生成具有用于优化操作的足够依赖性的泡。本领域的普通技术人员将理解在根据本发明的方法和系统生成泡的过程中,必须维持适当的眼内压进而避免对眼部结构的损伤。每个单独的泡的大小可为例如约0.5至约1.2ml、约0.8至约1.2ml、约0.9至约1.2ml、约0.9至约1.0ml、约1.0至约2.0ml、约1.0至约3.0ml。因此,在一个实例中,为注射共3ml的rAAV组合物悬浮液,可建立每个约1ml的3个泡。全部泡的组合的总体积可为例如约0.5至约3.0ml、约0.8至约3.0ml、约0.9至约3.0ml、约1.0至约3.0ml、约0.5至约1.5ml、约0.5至约1.2ml、约0.9至约3.0ml、约0.9至约2.0ml、约0.9至约1.0ml。

[0428] 为安全并有效地转导泡最初位置边缘外的靶视网膜(例如中心视网膜)区域,可操纵泡以将泡重新定位至靶区域以供转导。泡的操纵可通过由泡体积生成的泡的依赖性、包含泡的眼部的重新定位、具有包含一个或多个泡的一只眼或双眼的人头部的重新定位和/或通过流体-空气交换的方式发生。这与中心视网膜是特别相关的,因为该区域通常通过视网膜下注射抵抗脱落。在一些实施方案中,利用流体-空气交换以重新定位泡;来自输液套管的流体由空气临时替换,例如来自将空气吹至视网膜表面上。当空气的体积从视网膜的表面排出玻璃体腔流体时,玻璃体腔中的流体可以从套管中流出。来自玻璃体腔流体的压力的临时缺少使泡移动并受引力作用至眼部的从属部分。通过适当定位眼球,视网膜下的rAAV组合物的泡经操纵以涉及邻近区域(例如黄斑和/或中央凹)。在一些情况中,泡的重量足以引起其发生引力作用,即使不使用流体-空气交换。泡向预期位置的移动可进一步由改变受试者头的位置促进,进而允许泡受引力作用至眼中的预期位置。一旦实现泡的预期构造,流体返回至玻璃体腔。流体是适当的流体,例如新鲜盐水。一般而言,视网膜下rAAV组合物可留在原处而无视网膜粘结石至视网膜切开术且无眼内填塞,且视网膜将在约48小时内自发重新附着。

[0429] 通过使用包含治疗性多肽或RNA序列的载体安全并有效地转导眼部细胞(例如小梁网的细胞),本发明的方法可用于治疗具有肌纤蛋白(MYOC)青光眼的个体例如人,其中转导的细胞以足以治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的量产生治疗性多肽或RNA序列。

[0430] 取决于治疗目的,施用有效量的rAAV(在一些实施方案中以颗粒的形式)。例如,当低百分比的转导可实现预期治疗效果时,则治疗目的一般满足或超过该转导水平。在一些情况中,该转导水平可通过转导仅约1-5%的靶细胞实现,在一些实施方案中至少约20%的预期组织类型的细胞,在一些实施方案中至少约50%,在一些实施方案中至少约80%,在一些实施方案中至少约95%,在一些实施方案中至少约99%的预期组织类型的细胞。如上文讨论,与HSPG相互作用的rAAV衣壳的一个或多个氨基酸的取代改进rAAV转导。作为指导,每次注射施用的颗粒数目一般在约 1×10^6 至约 1×10^{14} 颗粒间,约 1×10^7 至 1×10^{13} 颗粒间,约 1×10^9 至 1×10^{12} 颗粒间或约 1×10^{11} 颗粒。rAAV组合物可通过一次或多次视网膜下注射施用,在相同操作过程中或按天、周、月或年间隔开。在一些实施方案中,可将多重载体用于治疗人。

[0431] 在一些实施方案中,将有效量的rAAV病毒颗粒施用至眼部导致大于约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或100%的任何或其间任何%的眼部细胞转导。在一些实施方案中,约5%至约100%、约10%至约50%、约10%至约30%、约25%至约75%、约25%至约50%或约30%至约50%的眼部细胞转导。鉴定由包含rAAV衣壳的AAV病毒颗粒转导的眼部细胞的方法为本领域已知,例如免疫组化或标

记物的使用如增强的绿色荧光蛋白可用于检测病毒颗粒的转导。

[0432] 在一些实施方案中,有效量的rAAV病毒颗粒向小梁网的施用导致大于约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或100%的任何或其间任何%的小梁网细胞转导。在一些实施方案中,约5%至约100%、约10%至约50%、约10%至约30%、约25%至约75%、约25%至约50%或约30%至约50%的小梁网细胞转导。鉴定由包含rAAV衣壳的AAV病毒颗粒转导的小梁网细胞的方法为本领域已知,例如免疫组化或标记物的使用如增强的绿色荧光蛋白可用于检测病毒颗粒的转导。

[0433] 在本发明的一些实施方案中,所述方法包括对哺乳动物的眼部施用有效量的AAV病毒颗粒用于治疗具有肌纤蛋白(MYOC)青光眼的个体,例如具有肌纤蛋白(MYOC)青光眼的人。在一些实施方案中,将组合物注射至眼中的一个或多个位置以允许异源核酸在眼部细胞中的表达。在一些实施方案中,将组合物注射入眼中1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或大于10处位置的任一种。

[0434] 在本发明的一些实施方案中,所述方法包括对哺乳动物的小梁网施用有效量的AAV病毒颗粒用于治疗具有肌纤蛋白(MYOC)青光眼的个体,例如具有肌纤蛋白(MYOC)青光眼的人。在一些实施方案中,将组合物注射至小梁网中的一处或多处位置以允许异源核酸在小梁网细胞中的表达。在一些实施方案中,将组合物注射入小梁网中1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或大于10处位置的任一种。

[0435] 在一些实施方案中,将rAAV病毒颗粒同时或顺序施用至多于一处的位置。在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒的多重注射不超过1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、9小时、12小时或24小时间隔。

[0436] 玻璃体内注射的方法

[0437] 用于玻璃体内注射的一般方法可通过下列简要概述说明。该实例仅意在说明所述方法的一些特征,且并非是以任何方式限制。用于玻璃体内注射的操作为本领域已知(参见例如Peyman,G.A.,等(2009)Retina 29(7):875-912及Fagan,X.J.和Al-Qureshi,S.(2013)Clin.Experiment.Ophthalmol.41(5):500-7)。

[0438] 简言之,用于玻璃体内注射的受试者可通过扩张瞳孔、灭菌眼睛和施用麻醉剂制备用于操作。本领域已知的任何适当散瞳剂可用于瞳孔扩张。充分的瞳孔扩张可在治疗前确认。灭菌可通过应用眼部灭菌治疗实现,例如包含碘化物的溶液如Povidone-Iodine (BETADINE®)。相似的溶液也可用于清洁眼睑、睫毛和任何其他邻近的组织(例如皮肤)。可以任何适当的浓度使用任何适当的麻醉剂,如利多卡因或普拉卡因。麻醉剂可通过任何本领域已知的方法施用,包括但不限于局部滴剂、凝胶或冻状物,和麻醉剂的结膜下应用。

[0439] 注射前,灭菌的眼睑窥器可用于从该区域清除睫毛。注射位点可以注射标记。注射的位点可基于患者的晶状体选择。例如,注射位点可距离假性或非晶状体患者中角膜缘的3-3.5mm,和晶状体患者角膜缘的3.5-4mm。患者可看向与注射位点相反的方向。

[0440] 注射过程中,针可以垂直于巩膜并指向眼部中心插入。可插入针进而末端终止于玻璃体中,而非视网膜下间隙。可使用本领域已知的任何适于注射的体积。注射后,可使用灭菌剂如抗生素治疗眼部。还可润洗眼部以去除过量的灭菌剂。

[0441] 房内注射方法

[0442] 向眼部房内注射的方法为本领域已知。房内注射的非限制性实例由Buie, et al., (2010) IOVS 51(1):236-248提供。

[0443] 通过玻璃体内或房内注射的rAAV递送的有效性可通过本文所述的数种标准监测。例如,使用本发明的方法在受试者中治疗后,可通过一项或多项临床参数包括本文所述的那些评估受试者一种或多种疾病状态的征兆或症状进展的例如改进和/或稳定和/或延迟。这些测试的实例为本领域已知,且包括客观和主观(例如受试者报告的)测量。例如,测量治疗对受试者视觉功能的有效性,可评估下述一项或多项:受试者主观的视觉质量或改善的中心视觉功能(例如,受试者流畅阅读和识别人脸的能力的改善)、受试者视觉移动性(例如通过迷宫所需时间的减少)、视觉敏锐度(例如,受试者LogMAR评分的改进)、微量测定法(例如,受试者dB评分的改进)、暗适应的视野测量(例如,受试者dB评分的改进)、精细矩阵映射(例如,受试者dB评分的改进)、Goldmann视野测量(例如,减少的暗点区域的大小(即失明区域)和解析较小目标的能力的改善)、闪烁敏感性(例如赫兹的改善)、自发荧光和电生理测量(例如ERG的改善)。在一些实施方案中,视觉功能通过受试者的视觉移动性测量。在一些实施方案中,视觉功能通过受试者的视觉敏锐度测量。在一些实施方案中,视觉功能通过微量测定法测量。在一些实施方案中,视觉功能通过暗适应的视野测量进行测量。在一些实施方案中,视觉功能通过ERG测量。在一些实施方案中,视觉功能通过受试者主观的视觉质量测量。

[0444] 对于本文所述任何方法或组合物,可将用于肌纤蛋白(MYOC)青光眼的医疗测试用于评估本文所述的治疗效力或诊断从本文所述的治疗获益的患者。用于诊断或监测肌纤蛋白(MYOC)青光眼的多种医疗测试为本领域已知。例如,可将检眼镜、激光偏光仪、眼部相干断层扫描和/或扫描激光断层扫描用于检查可能由肌纤蛋白(MYOC)青光眼损伤的视神经。眼内压可通过眼压测量进行测量。厚度计可用于测量中心角膜厚度(例如,薄中央角膜厚度可预测肌纤蛋白(MYOC)青光眼)。视野测试可用于评估视野。

[0445] 如上文所述,肌纤蛋白突变已牵涉原发性开角型肌纤蛋白(MYOC)青光眼(POAG)。因此,用于诊断POAG的医疗测试可用于评估本文所述的治疗的效力或诊断可从本文所述的治疗获益的患者。可使用任何本领域已知的用于诊断POAG的医疗测试,例如将POAG与另一形式的肌纤蛋白(MYOC)青光眼(如闭角型青光眼)进行区分。例如,前房角镜可用于提供辅助POAG诊断的评估。

[0446] 肌纤蛋白(MYOC)青光眼的治疗效力可在动物模型中测试。肌纤蛋白(MYOC)青光眼的动物模型为本领域已知。例如,表达Y437H人MYOC或Y423H小鼠MYOC的小鼠已证明发展与POAG相似的肌纤蛋白(MYOC)青光眼症状(参见Zode等(2011) J.Clin. Invest. 121(9):3542-53和Senatorov, V., 等(2006) J. Neurosci. 26(46):11903-14)。此外,缺少一氧化氮受体可溶性鸟苷酸环化酶的 α 亚基的小鼠是POAG的另一模型(Buys, E.S., 等(2013) PLoS ONE 8(3):e60156)。还建立了大鼠模型;表达经由腺病毒基因转移递送的人TGF- β 的大鼠显示增加的IOP(Shepard, A.R., 等(2010) Invest. Ophthalmol. 51(4):2067-76)。POAG多个方面的其他动物模型包括灵长类动物、狗和斑马鱼模型的进一步说明可在Bouhenni, R.A., 等(2012) J. Biomed. Biotechnol. 2012:692609)中获得。

[0447] 在一些眼部病症中,存在“滋养细胞(nurse cell)”现象,其中改进一种类型的细胞的功能可改进另一种的功能。例如,通过本发明的rAAV对中心视网膜的RPE转导可随后改

善视杆细胞的功能,且改善的视杆细胞的功能继而导致改善的视锥细胞功能。因此,治疗一种类型的细胞可导致另一种功能的改善。在肌纤蛋白(MYOC)青光眼中,通过转导TM减少IOP将减少神经节细胞结构和功能的退化。

[0448] 特定rAAV载体和组合物的选择取决于多种不同因素,包括但不限于个人的病史和病况特征和待治疗的个体。这些特征的评估和适当治疗方案的设计最终是处方医师的职责。

[0449] 本发明的组合物(例如编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04或其功能性变体和/或MYOC RNAi(例如shRNA)的AAV病毒颗粒)可单独或与一种或多种用于治疗眼部病症的其他治疗剂组合使用。顺序施用的时间间隔可以按照至少(或可替换地少于)分钟、小时或天。

[0450] 在一些实施方案中,可将一种或多种其他治疗剂施用至小梁网。其他治疗剂的非限制性实例包括前列腺素如适利达(Xalatan)、Lumigan、Travatan Z和Rescula; β -阻断剂包括Timoptic XE、Istalol和Betoptic S; α -肾上腺素能激动剂包括碘吡啶(Iopidine)、阿尔法糖(Alphagan)和阿尔法糖-P;碳酸酐酶抑制剂包括Trusopt和Azopt、Diamox、Neptazane和Daramide;副交感神经药包括毛果芸香碱、卡巴胆碱、二乙氧磷酰硫胆碱和癸二胺苯酯;肾上腺素包括丙炔;或组合治疗包括可索达(Cosopt)、Combigan和DuoTrav。

[0451] IV. 表达构建体

[0452] 本发明提供通过包含异源核酸的rAAV载体的视网膜下递送将异源核酸递送至眼部的方法,且其中所述rAAV载体封装在包含一个或多个与HSPG相互作用的氨基酸取代的rAAV衣壳中。在一些实施方案中,异源核酸(例如转基因)与启动子可操作连接。示例性的启动子包括但不限于巨细胞病毒(CMV)即刻早期启动子、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子和CK6启动子、转甲状腺素启动子(TTR)、TK启动子、四环素响应启动子(TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝特异性启动子(LSP)、E2F启动子、端粒酶(hTERT)启动子、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白/兔 β -珠蛋白启动子(CAG启动子;Niwa等, Gene, 1991, 108(2):193-9)和伸长因子1- α 启动子(EF1- α)启动子(Kim等, Gene, 1990, 91(2):217-23和Guo等, Gene Ther., 1996, 3(9):802-10)。在一些实施方案中,启动子包含人 β -葡糖苷酸酶启动子或与鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子连接的巨细胞病毒增强子。启动子可以是组成型、诱导型或阻遏型启动子。在一些实施方案中,启动子能够在眼部细胞中表达异源核酸。在一些实施方案中,启动子能够在感光细胞或RPE中表达异源核酸。在实施方案中,启动子是视紫红质激素(RK)启动子;例如人RK启动子。在一些实施方案中,启动子是视蛋白启动子;例如人视蛋白启动子或小鼠视蛋白启动子。在一些实施方案中,启动子是RNA聚合酶III启动子。在一些实施方案中,本发明提供通过将rAAV颗粒施用至哺乳动物眼部在哺乳动物中治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的方法,所述rAAV颗粒包含编码在CBA启动子控制下的RSP01、RSP02、RSP03、RSP04多肽或其功能性变体的rAAV载体。在一些实施方案中,本发明提供通过将rAAV颗粒施用至哺乳动物眼部在哺乳动物(例如人)中治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的方法,所述rAAV颗粒包含编码在CBA启动子下的靶向(例如减少或抑制)MYOC(例如人MYOC)的RNAi(例如shRNA)的rAAV载体。在一些实施方案中,本发明提供通过将包含编码在CBA启动子控制下的RSP01、RSP02、RSP03、RSP04多肽或其功能性变体的rAAV载体的rAAV颗粒和包含编码在CBA启动子控制下的靶向(例如减少或抑制)MYOC(例如人MYOC)的RNAi(例如shRNA)的rAAV载体的rAAV颗粒施用至哺乳动物眼部在哺乳动物(例

如人)中治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的方法。在一些实施方案中,本发明提供通过将rAAV颗粒施用至哺乳动物眼部在哺乳动物(例如人)中治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的方法,所述rAAV颗粒包含编码在CBA启动子控制下的RSP01、RSP02、RSP03、RSP04多肽或其功能性变体的rAAV载体和在CBA启动子控制下的靶向(例如减少或抑制)MYOC(例如人MYOC)的RNAi(例如shRNA)。

[0453] 本发明预期重组病毒基因组用于引进一种或多种编码治疗性多肽的核酸序列和/或用于包装入rAAV病毒颗粒的核酸的重组病毒基因组的用途。重组病毒基因组可包括任何元件以建立治疗性多肽和/或核酸的表达,例如启动子、ITR、核糖体结合元件、终止子、增强子、选择性标记、内含子、多聚A信号和/或复制起点。

[0454] 一些方面,本发明提供包含重组自身互补基因组的病毒颗粒。具有自身互补基因组的AAV病毒颗粒和使用自身互补AAV基因组的方法描述于美国专利号6,596,535;7,125,717;7,765,583;7,785,888;7,790,154;7,846,729;8,093,054和8,361,457;和Wang Z., et al., (2003) Gene Ther 10:2105-2111,其每一篇在本文以其全文通过提述并入。包含自身互补基因组的rAAV将凭借其部分互补序列迅速形成双链DNA分子(例如,转基因的互补编码和非编码链)。在一些实施方案中,第一异源核酸序列和第二异源核酸序列通过突变的ITR(例如正确的ITR)连接。在一些实施方案中,ITR包含多核苷酸序列5'-CACTCCCTCTCTGCGCTCTGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAA AGGTCGCCACGCCGGGCTTTGCCGGGCG-3'(SEQ ID NO:20)。突变的ITR包含含有末端解析序列的D区的缺失。结果是,在复制AAV病毒基因组时,rep蛋白将不会在突变的ITR切割病毒基因组,且由此以5'-3'顺序包含下述的重组病毒基因组将包装入病毒衣壳:AAV ITR、包含调节序列的第一异源多核苷酸序列、突变的AAV ITR、与第一异源多核苷酸反向的第二异源多核苷酸和第三AAV ITR。

[0455] VI. 病毒颗粒和产生病毒颗粒的方法

[0456] rAAV病毒颗粒

[0457] 本发明提供使用rAAV颗粒治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的方法并提供包含rAAV颗粒的组合物。在一些实施方案中,病毒颗粒是包含核酸的重组AAV颗粒,所述核酸含有编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04多肽或其功能性变体和/或本文所述的MYOC RNAi(例如shRNA)的序列,所述序列侧翼为一个或两个ITR。核酸封装在AAV颗粒中。AAV颗粒还包含衣壳蛋白。在一些实施方案中,核酸包含转录方向的感兴趣的编码序列可操作连接组分(例如编码RSP01,RSP02,RSP03,RSP04多肽或其功能性变体的核酸,和/或MYOC RNAi(例如shRNA))、控制序列包括转录初始和终止序列,由此形成表达盒。表达盒在5'和3'末端侧翼为至少一个功能性AAV ITR序列。“功能性AAV ITR序列”意为ITR序列用于AAV病毒粒子的救援、复制和包装目的发挥功能。参见Davidson等,PNAS,2000,97(7)3428-32;Passini等,J.Virol.,2003,77(12):7034-40;和Pechan等,Gene Ther.,2009,16:10-16,其在本文全部通过提述并入。为实践本发明的一些方面,重组载体至少包含对于通过rAAV感染的壳体化和物理结构至关重要的全部AAV序列。用于本发明的载体中使用的AAV ITR不需要具有野生型核苷酸序列(例如,如Kotin,Hum.Gene Ther.,1994,5:793-801中所述),且可通过核苷酸的插入、缺失或取代改变或AAV ITR可源自数种AAV血清型的任何。目前已知多于40种的AAV血清型,且新的血清型和现有血清型的变体持续被鉴别。参见Gao等,PNAS,2002,99(18):11854-6;Gao等,PNAS,2003,100(10):6081-6;和Bossis等,J.Virol.,2003,77(12):6799-810。任何

AAV血清型的使用都考虑在本发明的范围内。在一些实施方案中，rAAV载体是源自AAV血清型的载体，包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAVDJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV等。在一些实施方案中，AAV中的核酸包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAVDJ、山羊AAV、牛AAV的ITR或小鼠AAV血清型反向末端重复(ITRs)等的ITR。在一些实施方案中，AAV中的核酸进一步编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04多肽或其功能性变体；MYOC RNAi(例如shRNA)；或RSP01、RSP02、RSP03、RSP04多肽或其功能性变体和如本文所述的MYOC。例如，AAV中的核酸可包含本文设计的任何AAV血清型的至少一种ITR且可进一步编码对靶向SEQ ID NO:6的MYOC RNAi(例如shRNA)进行编码并包含SEQ ID NO:7的环序列的核酸和/或下述一种或多种：包含SEQ ID NO:8、11和/或12的RSP01；包含SEQ ID NO:9、13和/或14的RSP02；包含SEQ ID NO:1、15、16和/或17的RSP03和包含SEQ ID NO:10、18和/或19的RSP04。在一些实施方案中，所述核酸编码与SEQ ID NO:8、11或12至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的RSP01；与SEQ ID NO:9、13或14至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的RSP02；与SEQ ID NO:1或15-17至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的RSP03；或与SEQ ID NO:10、18或19至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的RSP04。

[0458] 在其他实施方案中，rAAV颗粒包含下述的衣壳蛋白：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6(例如野生型AAV6衣壳或变体AAV6衣壳如ShH10，如U.S.PG Pub.2012/0164106中所述)、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9(例如野生型AAV9衣壳，或如U.S.PG Pub.2013/0323226中所述的修饰的AAV9衣壳)、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、酪氨酸衣壳突变体、发夹结和衣壳突变体、AAV2R471A衣壳、AAVA2/2-7m8衣壳、AAV DJ衣壳(例如AAV-DJ/8衣壳、AAV-DJ/9衣壳或任何U.S.PG Pub.2012/0066783中所述的其他衣壳)、AAV2 N587A衣壳、AAV2 E548A衣壳、AAV2 N708A衣壳、AAV V708K衣壳、山羊AAV衣壳、AAV1/AAV2嵌合衣壳、牛AAV衣壳、小鼠AAV衣壳、rAAV2/HBoV1衣壳或U.S.Pat.No.8,283,151或国际公开号WO/2003/042397中所述的AAV衣壳。在一些实施方案中，AAV病毒颗粒包含在位置R484,R487,K527,K532,R585或R588的一处或多处含有氨基酸取代的AAV衣壳，其基于AAV2的VP1编号。在其他实施方案中，rAAV颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型的衣壳蛋白。在一些实施方案中，突变体衣壳蛋白保持形成AAV衣壳的能力。在一些实施方案中，rAAV颗粒包含允许小梁网转导的衣壳蛋白。在一些实施方案中，rAAV颗粒包含允许小梁网转导的突变体衣壳蛋白。在一些实施方案中，rAAV颗粒包含AAV2的衣壳蛋白，其中所述衣壳蛋白包含R471A氨基酸取代，其基于AAV2的VP1编号(Lochrie et al., J Virol(2006) 80(2):821-834)。在一些实施方案中，本发明提供包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04多肽或其功能性变体的载体的rAAV颗粒；包含R471A氨基酸取代的AAV2衣壳，其基于AAV2的VP1编号和/或编码MYOC RNAi(例如shRNA)的载体。

[0459] 在一些实施方案中，本发明提供在哺乳动物中治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的组合物和方法，其中将包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04多肽或其功能性变体的rAAV载体的rAAV2病毒颗粒递送至哺乳动物的眼部(其中可转导眼部的不同部分(例如视网膜))并将包

含编码MYOC RNAi的rAAV载体的rAAV2 R471A病毒颗粒递送至哺乳动物的眼部(其中转导了小梁网的细胞)。在一些实施方案中,本发明提供在哺乳动物中治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的组合物和方法,其中将包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04多肽或其功能性变体的rAAV载体的rAAV2 R471A病毒颗粒和包含编码MYOC RNAi的rAAV载体的rAAV2 R471A病毒颗粒递送至哺乳动物的眼部(其中转导了小梁网的细胞)。在一些实施方案中,本发明提供在哺乳动物中治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼的组合物和方法,其中将包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04多肽或其功能性变体和编码MYOC RNAi的rAAV载体的rAAV2 R471A病毒颗粒递送至哺乳动物的眼部(其中转导了小梁网的细胞)。

[0460] 一些方面,本发明提供递送转基因的组合物和方法(例如,至眼部小梁网的治疗性转基因)。在一些实施方案中,所述组合物和方法使用包含突变体衣壳的rAAV2颗粒,其中所述衣壳包含R471A氨基酸取代,其相对于AAV2的VP1编号。这样的组合物和方法可在治疗眼部疾病中使用;例如与小梁网相关的眼部疾病如肌纤蛋白(MYOC)青光眼。

[0461] 将不同的AAV血清型用于优化特定靶细胞的转导或靶向特定靶组织(例如患病组织)内的特定细胞类型。rAAV颗粒可包含相同血清型或混合血清型的病毒蛋白和病毒核酸。

[0462] 自身互补的AAV病毒基因组

[0463] 一些方面,本发明提供包含重组自身互补基因组的病毒颗粒。具有自身互补基因组的AAV病毒颗粒和使用自身互补AAV基因组的方法描述于美国专利号6,596,535;7,125,717;7,765,583;7,785,888;7,790,154;7,846,729;8,093,054和8,361,457;和Wang Z.等,(2003)Gene Ther 10:2105-2111,其每一篇在本文通过提述以其全文并入。包含自身互补基因组的rAAV将凭借其部分互补的序列迅速形成双链DNA分子(例如,转基因的互补编码和非编码链)。在一些实施方案中,本发明提供包含AAV基因组的AAV病毒颗粒,其中rAAV基因组包含第一异源多核苷酸序列(例如miR-708和/或视紫红质编码链)和第二异源多核苷酸序列(例如miR-708的反义链和/或视紫红质非编码链或反义链),其中所述第一异源多核苷酸序列可与第二多核苷酸序列沿其长度的大部分或全部形成链内碱基对。在一些实施方案中,第一异源多核苷酸序列和第二异源多核苷酸序列通过促进链内碱基配对的序列例如发夹DNA结构连接。发夹结构为本领域已知,例如在siRNA分子中。在一些实施方案中,第一异源多核苷酸序列和第二异源多核苷酸序列通过突变的ITR(例如右侧ITR)连接。在一些实施方案中,ITR包含多核苷酸序列5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCGCCACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG-3'(SEQ ID NO:20)。突变的ITR包含含有末端解析序列的D区的缺失。结果是,当复制AAV病毒基因组时,rep蛋白将不会在突变的ITR切割病毒基因组且由此,以5'至3'顺序包含下述的重组的病毒基因组将包装入病毒衣壳:AAV ITR、包含调节序列的第一异源多核苷酸序列、突变的AAV ITR、与第一异源多核苷酸反向的第二异源多核苷酸和第三AAV ITR。在一些实施方案中,本发明提供包含重组病毒基因组的AAV病毒颗粒,所述基因组含有功能性AAV2 ITR、编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04多肽或其功能性变体和/或MYOC RNAi(例如shRNA)的第一多核苷酸序列、包含D区缺失并缺少功能性末端解析序列的突变的AAV2 ITR、包含与编码第一多核苷酸序列的RSP01、RSP02、RSP03、RSP04多肽或其功能性变体和/或MYOC RNAi(例如shRNA)的序列互补的序列的第二多核苷酸序列和功能性AAV2 ITR。

[0464] AAV颗粒的产生

[0465] rAAV颗粒可使用本领域已知的方法产生。参见例如美国专利号6,566,118;6,989,264和6,995,006。在实践本发明中,用于产生rAAV颗粒的宿主细胞包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、微生物和酵母。宿主细胞还可以是包装细胞,其中AAV rep和cap基因稳定保持在其中AAV载体基因组稳定保持的宿主细胞或生产细胞中。示例性的包装和生产细胞源自293、A549或HeLa细胞。使用本领域已知的标准技术纯化和配制AAV载体。

[0466] 一些方面,提供用于产生任何如本文公开的rAAV颗粒的方法,其包括(a)在产生rAAV颗粒的条件下培养宿主细胞,其中所述宿主细胞包含(i)一种或多种AAV包装基因,其中每种所述AAV包装基因编码AAV复制和/或壳体化蛋白;(ii)包含编码治疗性多核苷酸和/或如本文所述的侧翼为至少一个AAV ITR的核酸的rAAV原载体,和(iii)AAV辅助功能;和(b)回收由宿主细胞产生的rAAV颗粒。

[0467] 在其他实施方案中,纯化rAAV颗粒。如本文所述的术语“纯化”包括缺少至少一些其他组分的rAAV颗粒的制备物,所述组分在天然存在或初始制备所来自的rAAV颗粒中存在。因此,例如,分离的rAAV颗粒可使用纯化技术制备以从来源混合物如培养裂解物或生产培养基上清将其富集。富集可以多种方式测量,如例如通过溶液中存在的抗DNA酶颗粒(DRP)或基因组拷贝(gc)的比例或通过感染,或其可相对来源混合物中存在的第二潜在干扰物质测量,如污染物,包括生产培养污染物或生产中的污染物,包括辅助病毒、培养基组分等。

[0468] 本文还提供包含rAAV颗粒和药物上可接受的载剂的药物组合物,所述rAAV颗粒含有编码治疗性多肽和/或治疗性核酸的异源核酸,其中所述rAAV颗粒包含含有与HSPG相互作用的一个或多个取代或氨基酸的rAAV衣壳。所述药物组合物可适于任何本文所述的施用模式;例如通过视网膜下施用。

[0469] 在一些实施方案中,包含本文所述的rAAV和药物上可接受的载剂的药物组合物适于施用于人。这样的载剂为本领域已知(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences, 第15版, pp.1035-1038和1570-1580)。在一些实施方案中,包含本文所述的rAAV和药物上可接受的载剂的药物组合物适于眼部注射。这样的药物上可接受的载剂可以是无菌液体,如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,如花生油、大豆油、矿物油等。盐水溶液和葡萄糖水溶液、聚乙二醇(PEG)和甘油溶液还可作为液体载剂采用,特别是用于可注射的溶液。药物组合物可进一步包含其他成分,例如防腐剂、缓冲液、张力剂、抗氧化剂和稳定剂、非离子润湿剂或澄清剂、增粘剂等。本文所述的药物组合物可包装入单个单位剂量或多剂量形式中。组合物一般作为无菌和基本上等渗的溶液配制。

[0470] VII. 系统和试剂盒

[0471] 如本文所述的rAAV组合物可包含在经设计用于本文所述的本发明的方法之一中的系统内。在一些实施方案中,本发明提供用于将载体递送至个体眼部的系统,其包含a)包含有效量的rAAV颗粒的组合物,其中所述载体包含编码治疗性多肽和/或治疗性RNA和至少一个AAV末端重复的异源核酸;和b)用于rAAV眼部递送的装置。在一些实施方案中,所述rAAV颗粒包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04多肽或其功能性变体的rAAV载体。在一些实施方案中,rAAV颗粒包含编码靶向(例如减少或抑制)MYOC表达的一种或多种MYOC RNAi(例如shRNA)的rAAV载体。在一些实施方案中,rAAV颗粒包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04多肽或其功能性变体和靶向(例如减少或抑制)MYOC表达的一种或多种MYOC RNAi(例如

shRNA)的rAAV载体。在一些实施方案中,所述试剂盒或系统包含含有编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04多肽或其功能性变体的rAAV载体的rAAV颗粒和包含编码靶向(例如减少或抑制)MYOC表达的一种或多种MYOC RNAi(例如shRNA)的rAAV载体的rAAV颗粒。

[0472] 一般而言,所述系统包含细孔套管,其中所述套管是27-45计,一个或多个注射器(例如1、2、3、4或更多个)和一种或多种(例如1、2、3、4或更多种)适于在本发明的方法中使用的流体。

[0473] 细孔套管适于载体悬浮液和/或其他待注射入视网膜下间隙的流体的视网膜下注射。在一些实施方案中,套管是27-45计。在一些实施方案中,细孔套管是35-41计。在一些实施方案中,细孔套管是40或41计。在一些实施方案中,细孔套管是41计。套管可以是任何适当类型的套管,例如 **de-Juan®** 套管或 **Eagle®** 套管。

[0474] 注射器可以是任何适当的注射器,只要其能够与用于递送流体的套管连接。在一些实施方案中,注射器是 **Accurus®** 系统注射器。在一些实施方案中,系统具有一个注射器。在一些实施方案中,系统具有两个注射器。在一些实施方案中,系统具有三个注射器。在一些实施方案中,系统具有四个或更多个注射器。

[0475] 所述系统可进一步包含自动注射泵,其可通过例如脚踏板激活。

[0476] 适于在本发明的方法中使用的流体包括本文所述的那些,例如,各包含有效量的一种或多种本文所述的载体的一种或多种载体、用于生成初始泡的一种或多种流体(例如盐水或其他适当的流体)和一种或多种包含一种或多种治疗剂的流体。

[0477] 适于在本发明的方法中使用的流体包括本文所述的那些,例如各包含有效量的一种或多种如本文所述的载体的一种或多种流体、用于生成初始泡的一种或多种流体(例如盐水或其他适当的流体)和一种或多种包含一种或多种治疗剂的流体。

[0478] 在一些实施方案中,包含有效量的载体的流体的体积大于约0.8ml。在一些实施方案中,包含有效量的载体的流体的体积为至少约0.9ml。在一些实施方案中,包含有效量的载体的流体的体积为至少约1.0ml。在一些实施方案中,包含有效量的载体的流体的体积为至少约1.5ml。在一些实施方案中,包含有效量的载体的流体的体积为至少约2.0ml。在一些实施方案中,包含有效量的载体的流体的体积为大于约0.8ml至约3.0ml。在一些实施方案中,包含有效量的载体的流体的体积为大于约0.8ml至约2.5ml。在一些实施方案中,包含有效量的载体的流体的体积为大于约0.8ml至约2.0ml。在一些实施方案中,包含有效量的载体的流体的体积为大于约0.8ml至约1.5ml。在一些实施方案中,包含有效量的载体的流体的体积为大于约0.8ml至约1.0ml。在一些实施方案中,包含有效量的载体的流体的体积为约0.9ml至约3.0ml。在一些实施方案中,包含有效量的载体的流体的体积为约0.9ml至约2.5ml。在一些实施方案中,包含有效量的载体的流体的体积为约0.9ml至约2.0ml。在一些实施方案中,包含有效量的载体的流体的体积为约0.9ml至约1.5ml。在一些实施方案中,包含有效量的载体的流体的体积为约0.9ml至约1.0ml。在一些实施方案中,包含有效量的载体的流体的体积为约1.0ml至约3.0ml。在一些实施方案中,包含有效量的载体的流体的体积为约1.0ml至约2.0ml。

[0479] 用于生成初始泡的流体可为例如约0.1至约0.5ml。在一些实施方案中,系统中全部流体的总体积为约0.5至约3.0ml。

[0480] 在一些实施方案中,系统包含单一流体(例如包含有效量的载体的流体)。在一些

实施方案中,系统包含2种流体。在一些实施方案中,系统包含3种流体。在一些实施方案中,系统包含4种或更多种流体。

[0481] 本发明的系统可进一步包装入试剂盒,其中所述试剂盒可进一步包括使用说明。在一些实施方案中,试剂盒进一步包括用于rAAV颗粒组合物的视网膜下递送的装置。在一些实施方案中,使用说明包括根据本文所述方法之一的说明。在一些实施方案中,使用说明包括用于rAAV颗粒的玻璃体内和/或房内递送的说明,所述rAAV颗粒包含编码RSP01、RSP02、RSP03、RSP04多肽或其功能性变体和/或MYOC RNAi (例如shRNA)的载体。

实施例

[0482] 可通过参照下述实施例更完整地理解本发明。然而,其不应理解为是对本发明范围的限制。可以理解的是本文所述的实施例和实施方案仅出于阐述目的且基于其的多种修饰和改变将建议给本领域的技术人员且将包括在本申请的精髓和范围和附加的权利要求范围内。

[0483] 实施例1:青光眼MYOC突变(例如P370L和Y437H)阻断MYOC的分泌

[0484] 为理解MYOC突变体如何影响眼部功能,特别是可有助于IOP的细胞如小梁网细胞,将提供对肌纤蛋白(MYOC)青光眼发病机理的了解。理解MYOC功能还可以帮助揭示肌纤蛋白(MYOC)青光眼潜在的治疗策略。本文所述的结果证明MYOC突变体减少野生型MYOC表达并阻断Wnt信号传导。此外,这些结果表明R-脊椎蛋白3(RSP03)的表达和/或MYOC的沉默可恢复通过突变体MYOC的表达阻断的Wnt信号传导。

[0485] 方法

[0486] 质粒载体

[0487] 对于MYOC和RSP03质粒,MYOC cDNA由Clone DB-Sanofi Oncology提供。RSP03 cDNA由Clone DB-Sanofi Oncology提供。

[0488] 为构建pCBA2-in-MYOC P370L,依照制造商的推荐将 **QUIKCHANGE**[®] II试剂盒(Agilent,Santa Clara)和引物5'-ACCACGGACAGTTCCTGTATTCTTGGGGTGG-3'(SEQ ID NO:21)和5'-CCACCCAAGAATACAGGAACTGTCCGTGGT-3'(SEQ IDNO:22)用于引进预期的单碱基取代。

[0489] 为构建pCBA2-in-MYOC Y437H,依照制造商的推荐将 **QUIKCHANGE**[®] Lightning kit(Agilent,Santa Clara)和引物5'-TCTGTGGCACCTTGACACCGTCAGCAGC-3'(SEQ ID NO:23)和5'-GCTGCTGACGGTGTGCAAGTGCCACAGA-3'(SEQ ID NO:24)用于引进预期的单碱基取代。

[0490] Grp94 shRNA质粒获得自OriGene Technologies,Inc.(Cat.No.TR312309)。pGIPZ-MYOC质粒(Dharmacon GE Life Sciences)由Clone DB-Sanofi Oncology提供。GIPZ微小RNA-适合的shRNA集合(GIPZ microRNA-adapted shRNACollection,Stegmeier,等(2005)Proc.Natl.Acad.Sci.USA.102:13212-7)。GIPZ shRNA设计以天然的miR-30初始转录物为基础以通过内源RNAi通路使加工成为可能并以最小的细胞毒性导致特定的基因沉默。pGIPZ-Null质粒,表达非靶向、无效shRNAmir的组成型shRNAmir载体由Clone DB-Sanofi Oncology提供。

[0491] 细胞培养和重组蛋白

[0492] 在DMEM、10% FCS和5% CO₂中培养HEK293细胞(Microbix Biosystems Inc.)。从ATCC获得HEK293T(293T)细胞系并在DMEM、10% FCS和5% CO₂中培养。

[0493] 原代人小梁网(hTM)细胞的永生化

[0494] 经由使用AAV2-SV40 T-抗原载体的转导将SV40大T抗原(SV40Large T-antigen, SV40 TAg)用于永生化。将保持在完全成纤维细胞生长培养基(ScienCell)中的第7代hTM细胞(ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA)接种于10cm细胞培养平板上并使用 1×10^5 DRP的AAV2-SV40-Tag(标记为“hTM-T”)或AAV2-EGFP(阴性对照,标记为“hTM-ENT”)转导24小时。一旦细胞达到融合,将其传代至 2×15 cm平板上(P8)。约每3-4天重复传代细胞。在第10代,取一部分以确定细胞计数。来自hTM-T细胞的总细胞数为 5.2×10^6 ,相比之下来自hTM-ENT细胞为 2.5×10^5 总细胞。

[0495] 实施蛋白免疫印迹以确定SV40 T-抗原的存在。简言之,离心500uL的细胞悬浮液,并将获得的细胞沉淀裂解入包含蛋白酶抑制剂鸡尾酒混合物的100uL RIPA缓冲液。通过SDS-PAGE分析5uL的细胞裂解物,随后使用iBlot快速转移系统(Life Technologies)进行免疫印迹。印迹使用无TBS蛋白的阻断剂(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)阻断并与单克隆抗SV40 T-抗原抗体(GeneTex, Irvine, CA)温育。印迹随后与抗小鼠HRP标记的抗体(R&D Systems, Minneapolis, MN)温育。使用Supersignal West Femto Chemiluminescent Substrate(Thermo Fisher)可视化免疫反应性条带。从hTM-T而非hTM-ENT细胞检测到对应SV40 T-抗原的突出的80kDa条带,表明SV40T-抗原的存在和表达。来自293T细胞的裂解物作为阳性对照发挥作用,其也包含80kDa SV40 T-抗原条带。扩大hTM-T细胞并在第12代(以 1×10^6 细胞10瓶)和稍后在第18代(以 10^6 细胞46瓶)将细胞库冷冻在细胞冷冻介质(Life Technologies, Grand Island, NY)中。

[0496] hTM-T表征

[0497] hTM-T和原代hTM细胞的比较显示了细胞形态学、群体倍增时间和质粒转染效率的显著差异。原代hTM细胞看起来较大且呈成纤维细胞样,具有长的纺锤形细胞体,而永生化的hTM-T细胞较小,为立方形且大小相对均匀。hTM-T细胞系表明增加的生长速率,具有比原代细胞发生快约3-4倍的群体倍增。此外,hTM-T细胞超过20代细胞持续增殖,而原代hTM细胞到第10代显示减少的生长速率且到第12代显示最终的生长停滞。使用EGFP质粒确定转染效率并以相似的细胞密度脂质体转染(lipofectamine)至两种类型的细胞。简言之,根据制造商的方案使用Lipofectamine 2000(Life Technologies)以EGFP质粒转染亚汇合的hTM-T或hTM细胞。尽管hTM-T细胞具有更大的细胞数每mm²细胞培养表面,但相比原代hTM细胞(~5%)显然存在更大的EGFP+hTM-T细胞(~50%)百分比。

[0498] 蛋白免疫印迹

[0499] 使用Lipofectamine 2000(Life Technologies)以表达wtMYOC、MYOC突变体P370L和Y437H、RSP03和/或shRNA的质粒转染293T或hTM-T细胞。简言之,将细胞裂解入包含蛋白酶抑制剂鸡尾酒混合物的50-100uL RIPA缓冲液中。通过SDS-PAGE分析10-13uL的细胞裂解物,随后使用iBlot快速转移系统(Life Technologies)进行免疫印迹。使用Tris缓冲盐水、0.05%吐温20(TBST)、0.2% I-Block(基于酪蛋白的阻断试剂;Life Technologies)阻断印迹并使用小鼠抗人MYOC抗体温育。随后使用抗小鼠HRP标记的抗体(R&D Systems,

Minneapolis, MN) 温育印迹。使用ECL化学发光底物 (ECL Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher) 可视化免疫反应条带并在使用Kodak X-Omat 2000处理器显影的BioMax XAR膜 (Carestream Health) 上可视化。

[0500] 萤光素酶报告测定

[0501] 将293T或hTM-T细胞以 2×10^4 细胞/孔接种入Costar 96孔白色或黑色壁的平板。根据制造商的方案使用Fugene HD转染试剂 (Promega, Madison, WI) 在细胞接种后1-2天实施转染。

[0502] 简言之, 包含40:1比率的Tcf/lef调节的萤火虫萤光素酶报告基因和巨细胞病毒 (CMV) 驱动的海肾萤光素酶基因的Topflash报告质粒 (Millipore, Billerica, MA) 与靶质粒1:1混合。添加8 μ L的Fugene HD试剂, 并立即涡旋样品, 随后在室温温育15分钟。将质粒DNA复合物添加至细胞并在37 $^{\circ}$ C温育24小时。样品未经刺激或以400ng/mL的重组人或小鼠wnt3a蛋白 (R&D Systems) 刺激并额外温育20-24小时。根据制造商的方案使用双萤光素酶测定系统 (Promega) 测量Wnt信号传导。在Centro XS³ 960微板光度计 (Berthold Technologies, Oak Ridge, TN) 上测量吸收值并报告为相对光单位 (RLU)。为控制转染效率, 针对海肾萤光素酶RLU标准化萤火虫萤光素酶RLU。以三份孔实施全部样品。

[0503] 结果

[0504] 野生型MYOC (wtMYOC) 分泌自经培养的细胞, 但很少至无MYOC分泌自表达五种不同突变体形式的MYOC的细胞, 且已报导用正常和突变体MYOC对培养细胞的共转染抑制wtMYOC分泌 (Jacobson等 (2001) Hum. Mol. Genet. 10 (2) : 117-25)。为检查突变体MYOC表达对MYOC分泌的影响, 使用表达野生型MYOC、P370L突变体MYOC或Y437H突变体MYOC的质粒转染293细胞。

[0505] 如图1所示, 表达野生型MYOC的293细胞在两种细胞裂解物 (参见底部印迹标记的“细胞”) 中都显示可检测的MYOC蛋白表达并分泌入细胞培养基 (参见顶部印迹标记的“介质”)。然而, 使用表达P370L或Y437H MYOC的质粒转染的细胞显示细胞内表达但未分泌入细胞培养基。此外, 用表达野生型MYOC和P370L或Y437H MYOC的质粒的共转染导致MYOC分泌入细胞培养基的缺少。这些结果表明P370L和Y437H突变体不能从293细胞分泌且也能够阻断野生型MYOC的分泌。

[0506] 进行了进一步的实验以确定是否在人眼部细胞中观察到这些结果。如上文所述, 通过AAV-介导的SV40大T-抗原 (hTM-T细胞) 的表达永生化人小梁网细胞系。使用表达野生型MYOC的质粒、表达P370L MYOC的质粒转染293T和hTM-T细胞, 或使用两种质粒转染。图2显示蛋白免疫印迹, 其在这些细胞中探查细胞内或分泌的MYOC蛋白的存在。尽管野生型MYOC由293T和hTM-T细胞表达和分泌, 但293T和hTM-T细胞都表达P370LMYOC但未分泌P370LMYOC。P370L MYOC在293T和hTM-T两种细胞中还都阻断野生型MYOC的分泌。

[0507] 这些结果表明青光眼MYOC突变体 (例如P370L和Y437H) 都能够阻断野生型MYOC在人细胞中的分泌。此外, 突变体MYOC也能够阻断MYOC在hTM细胞中的分泌。

[0508] 实施例2: 青光眼MYOC突变 (例如P370L和Y437H) 阻断Wnt信号传导

[0509] 认为MYOC与Wnt信号传导通路的组分如卷曲蛋白 (Fzd) 家族的Wnt受体、分泌的卷曲蛋白相关蛋白 (sFRP) 家族的Wnt拮抗剂和Wnt抑制因子1 (WIF-1) 相互作用, 其调节刺激压力纤维形成的肌动蛋白细胞骨架的组织 (Kwon等 (2009) Mol. Cell. Biol. 29: 2139-54)。压力

纤维的形成对于小梁网(TM)的收缩性和IOP调节至关重要。然而,准确来说MYOC如何与Wnt信号传导连接和该连接如何影响IOP尚不知晓。基于细胞生物学实验,肌纤蛋白作为基质细胞蛋白的功能已被提出(Resch和Fautsch,2009;Koch等,2014)。其他小组已证实肌纤蛋白是少突胶质细胞分化的调节因子且参与小鼠中视神经的髓鞘化(Kwon等,2014)。

[0510] 已表明MYOC可作为Wnt信号传导的调节因子发挥作用且Wnt蛋白可通过执行器功能补偿肌纤蛋白的缺少(Kwon等(2009)Mol.Cell.Biol.29:2139-54)。数个小组报导了通过b-连环蛋白非依赖性机制作用的肌纤蛋白和Wnt蛋白作用间的相似性(Kwon和Tomarev(2011)J.Cell.Physiol.226(12):3392-402)。已报导青光眼TM(GTM)细胞中减少的Wnt信号传导是由于较高的sFRP1内源水平(Wang等(2008)J.Clin.Invest.118:1056-64;Lin和Hankenson(2011)J.Cell.Biochem.112:3491-501)。另一小组显示Wnt信号传导途径保护视网膜细胞系RGC-5免于升高的压力(Fragoso等(2011)Cell.Mol.Neurobiol.31(1):163-73)。

[0511] 从文献不清楚青光眼MYOC突变(例如P370L或Y437H)是否对TM中的Wnt信号传导具有任何影响。一项报导声称青光眼MYOC突变(其抑制MYOC从TM的分泌)对TM中Wnt信号传导的影响尚不知晓,如通过TOP-Flash Wnt信号传导测定所测量(Mao等(2012)Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.53(11):7043-51)。另一小组已报导P370L对Caco-2细胞中的Wnt信号传导具有刺激影响,通过TOP-Flash Wnt信号传导测定显示(Shen等(2012)PLoS ONE7(9):e44902)。

[0512] 相比之下,发明人发现了MYOC突变(例如P370L和Y437H)对293和TM细胞中的Wnt信号传导具有抑制影响,如通过TOP-Flash Wnt信号传导测定所显示,其报告β-连环蛋白活性。

[0513] 为评估MYOC P370L和Y437H突变体对Wnt信号传导的影响,使用TOP-Flash报告构建体和wtMYOC(“MYOC”)、P370L MYOC或Y437HMYOC质粒共转染293T细胞。添加重组小鼠Wnt3a(400ng/ml)后扩增Wnt信号传导并通过TOP-Flash测定测量。转染后测量萤光素酶活性(平均值+SD,n=4)并标准化至连续表达的海肾萤光素酶水平的转染对照。

[0514] 如图3所示,使用重组小鼠Wnt3刺激293T细胞引起TOP-Flash报道子的增加。野生型MYOC的表达未干扰Wnt信号传导,如通过TOP-Flash所测定。然而,野生型MYOC与P370L MYOC或Y437H MYOC的共表达阻断了293T细胞中TOP-Flash的活化。这些结果表明青光眼MYOC突变体(例如P370L和Y437H)的表达能够抑制人细胞中的Wnt信号传导。

[0515] 实施例3:由青光眼MYOC突变(例如P370L和Y437H)阻断Wnt信号传导的恢复

[0516] 之前的实施例证实青光眼MYOC突变体P370L和Y437H发挥作用以阻断人细胞中的Wnt信号传导。进行了其他实验以检查Wnt信号传导可通过其在表达这些MYOC突变体的细胞中恢复的潜在机制。

[0517] R-脊椎蛋白3(RSP03)是由RSP03基因编码的蛋白,其活化Wnt信号传导,且检查了RSP03的表达是否能够恢复当Wnt信号传导由突变体MYOC表达抑制时的Wnt信号传导。对于这些实验,与上述图3相似的是,293T细胞用TOP-Flash报道子构建体和wtMYOC(“MYOC”)、P370L MYOC、Y437HMYOC和/或RSP03质粒共转染,如标记。添加重组小鼠Wnt3a(400ng/ml)后扩增了Wnt信号传导并通过TOP-Flash测定进行了测量。转染后测量了萤光素酶活性(平均值+SD,n=3)并标准化至连续表达的海肾萤光素酶水平的转染对照。

[0518] 如图4中所示,RSP03表达引起了Wnt信号传导的增加,如通过TOP-Flash所测量。重要的是,相比仅表达P370L MYOC或Y437H MYOC时所观察的Wnt信号传导的抑制,RSP03与P370L MYOC或Y437H MYOC的共表达能够恢复Wnt信号传导。使用TOP-Flash报道分子构建体和wtMYOC(“MYOC”)、P370L MYOC、Y437H MYOC和/或RSP03质粒共转染293T细胞,如标记。添加重组小鼠Wnt3a(400ng/ml)后扩增了Wnt信号传导并通过TOP-Flash测定进行了测量。转染后测量了萤光素酶活性并标准化至连续表达的海肾萤光素酶水平的转染对照。

[0519] 为测试在hTM细胞中是否观察到相似的效果,使用TOP-Flash报道子构建体和wtMYOC(“MYOC w.t.”)、P370L MYOC和/或RSP03质粒共转染hTM-T细胞。如上文所述通过TOP-Flash测定测量了Wnt活性(萤光素酶活性显示为平均值+SD,n=3)。图5显示P370L MYOC的表达引起了Wnt信号传导的减少且能够减少共表达野生型MYOC的hTM-T细胞中的Wnt信号传导。RSP03的表达能够增加仅表达P370L MYOC或P370L MYOC与野生型MYOC的组成的hTM-T细胞中的Wnt信号传导。图4和5阐述的结果表明RSP03的表达恢复了表达青光眼MYOC突变体的细胞中的Wnt信号传导,如293T和hTM-T细胞。

[0520] 令人惊讶的是,已发现通过表达青光眼MYOC突变体抑制Wnt可由沉默MYOC(例如通过RNAi)逆转。在293T细胞中测试了MYOC shRNA对MYOC表达的影响。如图6中所示,相比乱序shRNA对照,MYOC shRNA减少了表达野生型MYOC的细胞中MYOC蛋白的表达。对于细胞内和分泌的MYOC都观察到该减少。

[0521] 图7显示hTM-T细胞中MYOC shRNA的影响。MYOC shRNA减少了共表达野生型和P370L突变体MYOC的hTM-T细胞中MYOC蛋白的表达。对于细胞内和分泌的MYOC都观察到该减少。与之相比,靶向Grp94的shRNA对MYOC表达无影响。Grp94是参与分泌蛋白的加工和转运的分子伴侣,且近期提出其可作为治疗剂用于患有一些情况的MYOC青光眼的患者,这是由于认为Grp94可促进MYOC突变体的清除(Suntharalingam等,(2012)J.Biol.Chem.287(48):40661-9)。乱序shRNA对照相似地对MYOC表达不具有影响。

[0522] 由于MYOC shRNA影响MYOC表达,接下来研究了其对Wnt信号传导的影响。如图8中所示,P370L MYOC的表达减少了293T细胞中的Wnt信号传导。Grp94 shRNA和乱序shRNA对照不能恢复由P370L MYOC抑制的Wnt信号传导。与之相反,MYOC shRNA增加了表达P370L MYOC的细胞中的Wnt信号传导至约野生型水平(即在不表达P370L MYOC的对照细胞中观察到的Wnt信号传导水平,如通过TOP-Flash所测量)。还发现RSP03的表达增加表达P370L MYOC的细胞中的Wnt信号传导,且RSP03与MYOC RNAi(例如shRNA)的组合表达导致表达P370L MYOC的细胞中Wnt信号传导的协同增加。

[0523] 尽管已提出抑制Grp94作为减少MYOC突变体影响的机制,本文所述的这些结果表明RSP03和/或MYOC shRNA的表达在MYOC突变体表达存在下的Wnt信号传导的去阻遏中更加有效。

[0524] 还检查了MYOC shRNA对表达Y437H MYOC的细胞中Wnt信号传导的影响。如图9中所示,P370L或Y437H MYOC的表达减少了293T细胞中的Wnt信号传导。然而,MYOC shRNA能够恢复表达P370L或Y437H MYOC的细胞中的Wnt信号传导。当表达乱序shRNA对照时未观察到该效果。

[0525] 总之,这些结果证实了由MYOC突变体(例如P370L和Y437H)阻断的Wnt信号传导可通过表达R-脊椎蛋白3(RSP03)和/或抑制MYOC(例如通过RNAi)恢复。

[0526] 实施例4: AAV2 R471A转导小梁网的细胞

[0527] 为确定AAV颗粒是否能够转导小梁网的细胞,将编码EGFP的AAV2载体包装入包含R471A氨基酸取代的AAV2颗粒的野生型AAV2颗粒(基于VP1编号)。通过使用AAV2 EGFP和AAV2 R471A EGFP处理hTM细胞(如上文所述)体外评估了病毒颗粒。如图10(左图)中所示,相比野生型AAV2,AAV2R471A EGFP显示了更高的TM细胞转导。为在体内评估TM细胞转导,将AAV2 EGFP和AAV2 R471A EGFP注射入小鼠眼部。随后处死小鼠并分析了EGFP表达。如图10(右图)中所示,AAV2 R471A EGFP相比野生型AAV2在体内显示了更高的TM细胞转导。

[0528] 实施例5: 肌纤蛋白(MYOC)青光眼动物模型中的RSP03表达或MYOC shRNA

[0529] 上述实施例证实了青光眼MYOC突变(例如P370L和Y437H)阻断Wnt信号传导,且该Wnt信号传导的抑制可通过R-脊椎蛋白3(RSP03)的表达或MYOC shRNA逆转。不希望受任何具体理论所限,认为MYOC突变(例如P370L和/或Y437H)可影响TM中的Wnt信号传导,由此调节IOP并有助于POAG。下述实验测试了经由AAV2载体递送的R-脊椎蛋白3(RSP03)表达或MYOC shRNA是否能够改善疾病小鼠模型中的青光眼症状。

[0530] 将POAG的小鼠模型用于检查在治疗肌纤蛋白(MYOC)青光眼中AAV介导的R-脊椎蛋白3(RSP03)表达和/或MYOC shRNA递送至眼部的效力。例如,可使用表达Y437H MYOC的小鼠模型(参见Zode等(2011) *J. Clin. Invest.* 121 (9):3542-53)。在该模型中,人Y437H MYOC在转基因小鼠中CMV启动子的控制下表达。使用该系统,Y437H MYOC在与肌纤蛋白(MYOC)青光眼相关的组织如小梁网和巩膜中表达。这些小鼠呈现大致正常的眼睛形态但在三个月龄后开始显示肌纤蛋白(MYOC)青光眼样症状,如增加的IOP和视神经的进行性、轴索变性。

[0531] 将表达GFP、小鼠RSP03、靶向小鼠MYOC(来自质粒pGIPZ#93的MYOC shRNA靶标和环序列;Dharmacon, GE Healthcare)的shRNA或乱序shRNA的转基因克隆入在来自质粒pCBA(2)-int-BGH的杂交鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子控制下的AAV2基因组,其还包含牛生长激素多聚腺苷酸化信号序列(Xu, R., 等(2001) *Gene Ther.* 8:1323-32)。随后将表达盒克隆入包含AAV2反向末端重复(ITR)的前病毒质粒载体pAAVSP70(Ziegler, R. J., 等(2004) *Mol. Ther.* 9:231-40)。包含侧翼为ITR的区的质粒sp70.BR/sFLT01中获得的AAV基因组的总大小为4.6kb。

[0532] 将AAV2基因组包装入具有R471A突变的AAV2衣壳以允许小梁网的感染或包装入野生型AAV2衣壳以允许视网膜神经节细胞的感染。使用“无病毒基因(gutless)”载体的方式使用三重转染方法将AAV2基因组包装入AAV2野生型或R471A衣壳(参见例如Xiao等(1998) *J. Virol.*, 3:2224-32)。简言之,使用治疗性基因和其调节元件替换rep和cap基因,两者都夹在5'和3'反向末端重复(ITR)间。在单独的质粒上以顺式提供rep和cap基因,且第三质粒有助于所需的腺病毒辅助基因。可替换地,通过复制缺陷的腺病毒提供所需的辅助基因和/或腺病毒辅助基因稳定整合入宿主细胞基因组。不希望受任何具体理论所限,假设病毒衣壳完整装配,且侧翼具有ITR的载体基因组随后经由衣壳孔插入衣壳(Myers和Carter(1980) *Virology*, 102:71-82)。包含基因组的衣壳随后经配制用于注射。

[0533] 使表达人Y437H MYOC的转基因小鼠生长至约3个月龄且随后随机分配入治疗组。麻醉小鼠并使用编码GFP、小鼠RSP03、靶向小鼠MYOC的shRNA或乱序shRNA的AAV载体经由玻璃体内或房内注射进行注射。在一个治疗组中,为测试视网膜神经节细胞中的效果,小鼠接受具有表达小鼠RSP03的野生型AAV2衣壳的AAV2载体的注射和在对侧眼睛中的具有表达

GFP的野生型AAV2衣壳的AAV2载体的注射。在一个治疗组中,为测试小梁网中的效果,小鼠接受具有表达靶向小鼠MYOC的shRNA的R471A AAV2衣壳的AAV2载体的注射和在对侧眼睛中的具有表达乱序shRNA的R471AAAV2衣壳的AAV2载体的注射。在一个治疗组中,小鼠在一只眼中接受表达小鼠RSP03的AAV载体和表达靶向小鼠MYOC的shRNA的AAV载体的混合物的注射且在对侧眼睛中接受表达GFP的AAV载体和/或表达乱序shRNA的AAV载体的注射。在一个治疗组中,小鼠在一只眼中接受表达小鼠RSP03的AAV载体并表达靶向小鼠MYOC的shRNA的注射且在对侧眼睛中接受表达GFP和表达乱序shRNA的AAV载体的注射。

[0534] 注射后以常规的时间间隔检查小鼠肌纤蛋白 (MYOC) 青光眼的症状,将接受实验治疗的眼和接受对照治疗的眼进行比较。通过眼压计测量IOP (Kim, C.Y., 等 (2007) *Eye (Lond.)* 21 (9):1202-9)。通过超声测厚仪测量角膜厚度 (Lively, G.D., 等 (2010) *Physiol. Genomics* 42 (2):281-6)。通过前房角镜检查评估虹膜角膜的角度。使用模式视网膜电图 (PERG) 通过分析对视觉刺激的模式视网膜电图响应测量了视网膜神经节细胞的功能 (Zode等 (2011) *J. Clin. Invest.* 121 (9):3542-53)。可处死小鼠并解剖眼部用于其他表型表征。例如,通过免疫荧光显微镜和/或透射电子显微镜评估了视网膜神经节细胞数和/或形态学。

[0535] 实施例6:RSP0家族蛋白恢复由青光眼MYOC突变阻断的Wnt信号传导的用途

[0536] 如实施例3中所证实,由MYOC突变体 (例如P370L和Y437H) 阻断的Wnt信号传导可通过R-脊椎蛋白3 (RSP03) 的表达恢复。为进一步理解该Wnt信号传导恢复的潜在机制,检查了不同RSP0家族成员和变体恢复Wnt信号传导的能力。

[0537] 人RSP0家族蛋白hRSP01、2、3和4分享相似的结构域结构,其包括弗林蛋白酶样富含Cys结构域、血小板反应素1型结构域和C-末端带正电荷的结构域,如图11和12说明。为检查恢复Wnt信号传导所需的功能结构域,生成了人RSP03的数个截短的变体。变体、每个变体中包括和排除的特定结构域示于图11、12、13A和14中。为测试RSP03变体对Wnt信号传导的影响,使用TOP-Flash报道子构建体和wtMYOC (“MYOC”) 或Y437H MYOC共转染293T细胞,且还使用全长或部分RSP03质粒进行了转染,如图15中所标记。添加重组人Wnt3a (400ng/ml) 后扩增了Wnt信号传导并通过TOP-Flash测定进行了测量。转染后测量了萤光素酶活性 (平均值+SD, n=3) 并标准化至组成型表达的海肾萤光素酶水平的转染对照。

[0538] 如实施例3中所述,突变体MYOC Y437H抑制293T细胞中的Wnt信号传导,如通过TOP-Flash测定所测量。图15显示在该测定中不同hRSP03截短的变体对Wnt信号传导的影响。如图15中所示,测试的全部hRSP03形式,部分和全长都具有Wnt恢复活性,其中全长的RSP03相比很多截短形式呈现更强效的活性。

[0539] 为测试不同RSP0家族成员对Wnt信号传导的影响,使用TOP-Flash报道子构建体和wtMYOC (“MYOC”) 或Y437H MYOC共转染293T细胞,且还使用全长或部分RSP01、RSP02或RSP04质粒进行了转染,如图16中所标记 (参见用于阐述RSP01、2、3和4截短形式的图12)。添加重组小鼠Wnt3a (400ng/ml) 后扩增了Wnt信号传导并通过TOP-Flash测定进行了测量。转染后测量了萤光素酶活性 (平均值+SD, n=3) 并标准化至组成型表达的海肾萤光素酶水平的转染对照。

[0540] 这些研究的结果示于图16。这些结果表明全长和截短的RSP01、2和4也具有Wnt恢复活性,其中全长的RSP0呈现比截短形式更强效的活性。全部RSP0家族成员和形式与Wnt3a

能够作用。

[0541] 序列

[0542] RSP03多肽序列(信号序列加下划线)

MHLRLISWLFILNFMEYIGSQNASRGRRRQRRMHPNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCKPRLFFALERIG
MKQIGVCLSSCPSGYYGTRYPDINKCTKCKADCDTCFNKNFCTKCKSGFYHLHGKCLDNCPEGLEANN
 [0543] HTMECVSIVHCEVSEWNPWSPCTKKGKTCGFKRGTTETRVREIIQHPSAKGNLCPPTNETRKCTVQRKKC
 QKGERGKGRERKRKPNKGESKEAIPDSKSLESSKEIPEQRENKQQKKRKVQDKQKSVSVSTVH
 (SEQ ID NO: 1)

[0544] RSP03多核苷酸序列

ATGCACTTGCGACTGATTTCTTGGCTTTTTATCATTGAACTTTATGGA
 ATACATCGGCAGCCAAAACGCCTCCCGGGGAAGGCGCCAGCGAAGAATGC
 ATCCTAACGTTAGTCAAGGCTGCCAAGGAGGCTGTGCAACATGCTCAGAT
 [0545] TACAATGGATGTTTGTTCATGTAAGCCCAGACTATTTTTGCTCTGGAAAG
 AATTGGCATGAAGCAGATTGGAGTATGTCTCTTTCATGTCCAAGTGGAT
 ATTATGGAACTCGATATCCAGATATAAATAAGTGTACAAAATGCAAAGCT
 GACTGTGATACCTGTTTCAACAAAATTTCTGCACAAAATGTAAGTGG

ATTTACTTACACCTTGAAAAGTGCCTTGACAATTGCCCAGAAGGGTTGG
 AAGCCAACAACCACTACTATGGAGTGTGTCAGTATTGTGCACTGTGAGGTC
 AGTGAATGGAATCCTTGGAGTCCATGCACGAAGAAGGGAAAAACATGTGG
 CTTCAAAAGAGGGACTGAAACACGGGTCCGAGAAATAATACAGCATCCTT
 [0546] CAGCAAAGGGTAACCTGTGTCCCCAACAAATGAGACAAGAAAGTGTACA
 GTGCAAAGGAAGAAGTGTGAGAAGGGAACGAGGAAAAAAGGAAGGGA
 GAGGAAAAGAAAAAACCTAATAAAGGAGAAAGTAAAGAAGCAATACCTG
 ACAGCAAAGTCTGGAATCCAGCAAAGAAATCCAGAGCAACGAGAAAAC
 AACAGCAGCAGAAGAAGCGAAAAGTCCAAGATAAACAGAAATCGGTATC
 AGTCAGCACTGTACTAG (SEQ ID NO: 2)

[0547] MYOC多肽序列

MRFFCARCCSFGPEMPAVQLLLLA CLVWDV GART AQLRKANDQSGRCQYTF SVASPNESSCPEQSQAM
 SVIHNLQRDSS TQR LDLEATKARLSSLES LLHQLTLDQAARPQETQEGLQRELGLRRERDQLETQTREL
 ETAYSNLLRDKSVLEEEKKRLRQENENLARRLESSSQEVARLRRGQCPQTRDTARAVPPGSREVSTWNL
 DTLAFQELKSELTEVPASRILKESPSGYLRSGEGDTGCGELVWVGEPLTLRTAETITGKYGVWMRDPKPT
 YPYTQETTWRIDTVGTDVRQVFEYDLISQFMQGYPSKVHILPRPLESTGAVVYSGSLYFQGAESRTVIRY
 ELNTE TVKAEKEIPGAGYHGQFPYSWGGYTDIDLAVDEAGLWVIYSTDEAKGAIVLSKLN PENLELEQT
 WETNIRKQSVANAFIICGTLTYVSSYTSADATVNFA YDTGTGISKTLTIPFKNRYKYSSMIDYNPLEKKLF
 AWDNLNMV TYDIKLSKM (SEQ ID NO: 3)

[0548] MYOC cDNA序列

ATGAGGTTCTTCTGTGCACGTTGCTGCAGCTTTGGGCTGAGATGCCAGCTGTCCAGCTGCTGCTTC
 TGGCTGCCTGGTGTGGGATGTGGGGCCAGGACAGCTCAGCTCAGGAAGGCCAATGACCAGAGTG
 GCCGATGCCAGTATACCTTCAGTGTGGCCAGTCCCAATGAATCCAGCTGCCAGAGCAGAGCCAGG
 CCATGTCAGTCATCCATAACTTACAGAGAGACAGCAGCACCCAACGCTTAGACCTGGAGGCCACCA
 AAGCTCGACTCAGCTCCCTGGAGAGCCTCCTCCACCAATTGACCTTGGACCAGGCTGCCAGGCCCC
 AGGAGACCCAGGAGGGGCTGCAGAGGGAGCTGGGCACCCCTGAGGCGGGAGCGGGACCAGCTGGA
 AACCCAAACCAGAGAGTGGAGACTGCCTACAGCAACCTCCTCCGAGACAAGTCAGTTCTGGAGGA
 AGAGAAGAAGCGACTAAGGCAAGAAAATGAGAATCTGGCCAGGAGGTTGGAAAGCAGCAGCCAG
 GAGGTAGCAAGGCTGAGAAGGGGCCAGTGTCCCCAGACCCGAGACACTGCTCGGGCTGTGCCACC
 AGGCTCCAGAGAAGTTTCTACGTGGAATTTGGACACTTTGGCCTTCCAGGAACTGAAGTCCGAGCT
 AACTGAAGTTCTGCTTCCCGAATTTGAAGGAGAGCCCATCTGGCTATCTCAGGAGTGGAGAGGG
 AGACACCGGATGTGGAGAAGTATGTTGGGTAGGAGAGCCTCTCACGCTGAGAACAGCAGAAACAA
 TTAAGTGGCAAGTATGGTGTGTGGATGCGAGACCCCAAGCCCACCTACCCCTACACCCAGGAGACCA
 CGTGGAGAATCGACACAGTTGGCACGGATGTCCGCCAGGTTTTTGGAGTATGACCTCATCAGCCAGTT
 TATGCAGGGTACCCTTCTAAGGTTACATACTGCCTAGGCCACTGGAAAGCAGCGGTGCTGTGGT
 GTACTCGGGAGCCTCTATTTCCAGGGCGCTGAGTCCAGAAGTGTGATAAGATATGAGCTGAATAC
 CGAGACAGTGAAGGCTGAGAAGGAAATCCCTGGAGCTGGCTACCACGGACAGTTCCCGTATTCTTG
 GGGTGGCTACACGGACATTGACTTGGCTGTGGATGAAGCAGGCCTCTGGGTCAATTTACAGCACCGA
 TGAGGCCAAAGGTGCCATTGCTCTCCAACTGAACCCAGAGAATCTGGAACCTCGAACAAACCTG
 GGAGACAAACATCCGTAAGCAGTCAGTCGCCAATGCCTTCATCATCTGTGGACCTTGTACACCGTC
 AGCAGCTACACCTCAGCAGATGCTACCGTCAACTTTGCTTATGACACAGGCACAGGTATCAGCAAG
 ACCCTGACCATCCATTCAAGAACCGCTATAAGTACAGCAGCATGATTGACTACAACCCCTGGAG
 AAGAAGCTCTTTGCTGGGACAACCTTGAACATGGTCACTTATGACATCAAGCTCTCCAAGATGTAG
 (SEQ ID NO: 4)

- [0549] MYOC shRNA靶序列
 GGCCATGTCAGTCATCCAT (SEQ ID NO: 5)
 QAMSVIH (SEQ ID NO: 6)
- [0550] shRNA环序列序列 AATAGTGAAGCCACAGATGTATT (SEQ ID NO: 7)
- [0551] RSP01多肽序列(信号序列加下划线)
MRLGLCVVALVLSWTHLTISSRGIKGRQRRISAEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKLFILLERNDIRQV
 GVCLPSCPPGYFDARNPDMNKCICKIEHCEACFSHNFCTKCKEGLYLHKGRGYACPEGSSAANGTMEC
- [0552] SSPAQCEMSEWSPWGPCSKKQQLCGFRRGSEERTRRVLHAPVGDHAACSDTKETRRTVRRVPCPEGQK
 RRRKGGQGRRENANRNLARKESKEAGAGSRRRKGQQQQQQTGTVGPLTSAGPA (SEQ ID NO: 8)
- [0553] RSP02多肽序列(信号序列加下划线)
MQFRLFSFALILNCDYSHCQGNRWRRSKRASYVSNPICKGCLSCSKDNGCSRCQQLFFFLLRREGMRQ
 YGECLEHSCPSGYYGHRAPDMNRCARCIENCDSFCDFCTKCKVGFYLRGRCFDECPDGFAPLEETME
- [0554] CVEGCEVGHWSEWGTCSRNNRTCGFKWGLETRTRQIVKKPKVDILTLCPTIAESRCKMTMRHCPGGKRT
 PKAKEKRNKKKKRKLIERAQEQHSVFLATDRANQ (SEQ ID NO: 9)
- [0555] RSP04多肽序列(信号序列加下划线)
MRAPLCLLLVAHAVDMLALNRRKKQVGTGLGGNCTGCIICSEENGSTCQQLFLFIRREGIRQYGKCL
 HDCPPGYFGIRGQEVNRCKKCGATCESCFSDFCIRCKRQFYLYK GKCLPTCPPGTLAHQNTRECQGECEL
- [0556] GPWGGWSPCTHNGKTCGSAWGLESRVREAGRAGHEEAATCQVLSERKCPQIRPCPGERSPGQKKGRKD
 RRPKDRKLDRLDVRPRQPGLQP (SEQ ID NO: 10)
- [0557] RSP01截短1-135多肽序列(信号序列加下划线)
MRLGLCVVALVLSWTHLTISSRGIKGRQRRISAEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKLFILLERNDIRQV
- [0558] GVCLPSCPPGYFDARNPDMNKCICKIEHCEACFSHNFCTKCKEGLYLHKGRGYACPEGSSA (SEQ ID
 NO: 11)
- [0559] RSP01截短1-206多肽序列(信号序列加下划线)
 -
MRLGLCVVALVLSWTHLTISSRGIKGRQRRISAEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKLFILLERNDIRQV
- [0560] GVCLPSCPPGYFDARNPDMNKCICKIEHCEACFSHNFCTKCKEGLYLHKGRGYACPEGSSAANGTMEC
 SSPAQCEMSEWSPWGPCSKKQQLCGFRRGSEERTRRVLHAPVGDHAACSDTKETRRTVRRVPC (SEQ ID
 NO: 12)
- [0561] RSP02截短1-134多肽序列(信号序列加下划线)

- [0562] MQFRLFSFALIILNCMDYSHCQGNRWRRSKRASYVSNPICKGCLSCSKDNGCSRQKLFLLRREGMRQ
YGECLHSCPSGYYGHRAPDMNRCARCRIENCSCFSKDFCTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFAP (SEQ ID
NO: 13)
- [0563] RSP02截短1-203多肽序列(信号序列加下划线)
- [0564] MQFRLFSFALIILNCMDYSHCQGNRWRRSKRASYVSNPICKGCLSCSKDNGCSRQKLFLLRREGMRQ
YGECLHSCPSGYYGHRAPDMNRCARCRIENCSCFSKDFCTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETME
CVEGCEVGHWSEWGTCSRNNRTC GFKWGLETRTRQIVKKPVKDTILCPTIAESRRCKMTMRHC (SEQ ID
NO: 14)
- [0565] RSP03截短1-135多肽序列(信号序列加下划线)
- [0566] MHLRLISWLFILNFMEYIGSQNASRGRRRQRRMHPNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCPKPRLFFALERIGMK
QIGVCLSSCPSGYYGTRYPDINKCTKCKADCDTCFNKNFCTKCKSGFYLLHLGKCLDNCPEGLEA (SEQ ID
NO: 15)
- [0567] RSP03截短1-146多肽序列(信号序列加下划线)
- [0568] MHLRLISWLFILNFMEYIGSQNASRGRRRQRRMHPNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCPKPRLFFALERIGMK
QIGVCLSSCPSGYYGTRYPDINKCTKCKADCDTCFNKNFCTKCKSGFYLLHLGKCLDNCPEGLEANNHTME
CVSIV (SEQ ID NO: 16)
- [0569] RSP03截短1-206多肽序列(信号序列加下划线)
- [0570] MHLRLISWLFILNFMEYIGSQNASRGRRRQRRMHPNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCPKPRLFFALERIGMK
QIGVCLSSCPSGYYGTRYPDINKCTKCKADCDTCFNKNFCTKCKSGFYLLHLGKCLDNCPEGLEANNHTME
CVSIVHCEVSEWNPWPSPCTKKGKTCGFKRGTTETRVREIHQHPSAKGNLCPPTNETRKCTVQRKCC (SEQ ID
NO: 17)
- [0571] RSP04截短1-128多肽序列(信号序列加下划线)
- [0572] MRAPLCLLLLVAHAVDMLALNRRKKQVGTGLGGNCTGCIICSEENGCSQCQRLFLFIRREGIRQYKCL
HDCPPGYFGIRGQEVNRCKKCGATCESCFSQDFCIRCKRQFYLYK GKCLPTCPPGTLA (SEQ ID NO: 18)
- [0573] RSP04截短1-195多肽序列(信号序列加下划线)
- [0574] MRAPLCLLLLVAHAVDMLALNRRKKQVGTGLGGNCTGCIICSEENGCSQCQRLFLFIRREGIRQYKCL
HDCPPGYFGIRGQEVNRCKKCGATCESCFSQDFCIRCKRQFYLYK GKCLPTCPPGTLAHQNTRECQGECEL
GPWGGWSPCTHNGKTCGSAWGLESRVREAGRAGHEEAATCQVLSERKCPPIQRP (SEQ ID NO: 19)
- [0575] 突变的ITR多核苷酸序列
CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCACGCCCGGGCTT
TGCCCCGGGCG (SEQ ID NO: 20)
- [0576] MYOC370L正向诱变引物(取代加下划线)
- [0577] ACCACGGACAGTTCCTIGTATTCTTGGGGTGG (SEQ ID NO: 21)
- [0578] MYOC370L反向诱变引物(取代加下划线)
- [0579] CCACCCCAAGAATACAGGAACTGTCCGTGGT (SEQ ID NO: 22)
- [0580] MYOCY437H正向诱变引物(取代加下划线)
- [0581] TCTGTGGCACCTTGCACACCGTCAGCAGC (SEQ ID NO: 23)
- [0582] MYOCY437H反向诱变引物(取代加下划线)
- [0583] GCTGCTGACGGTGTGCAAGGTGCCACAGA (SEQ ID NO: 24)

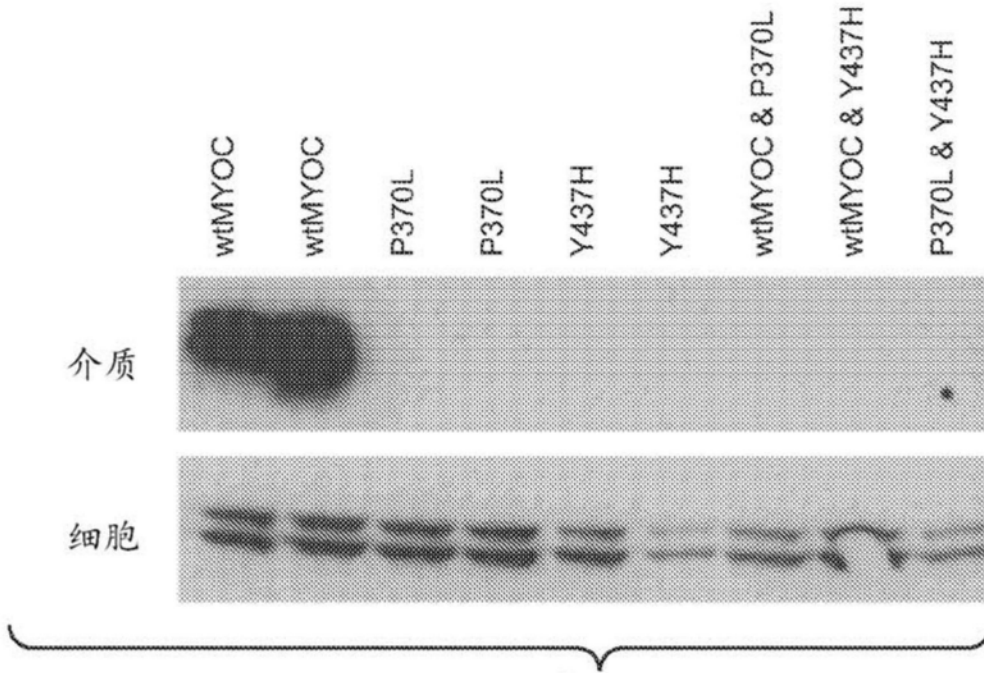


图1

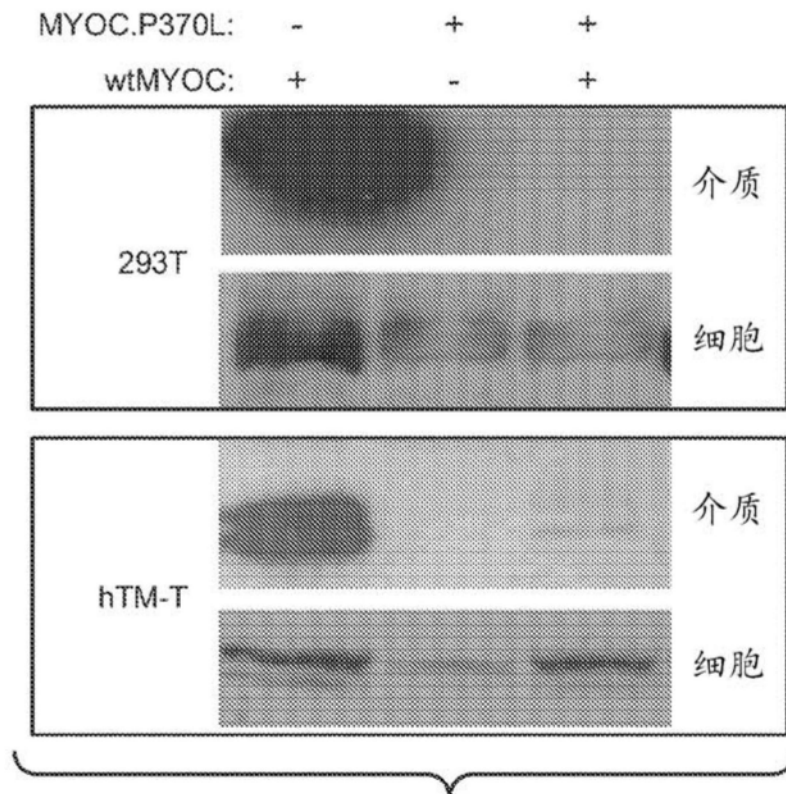


图2

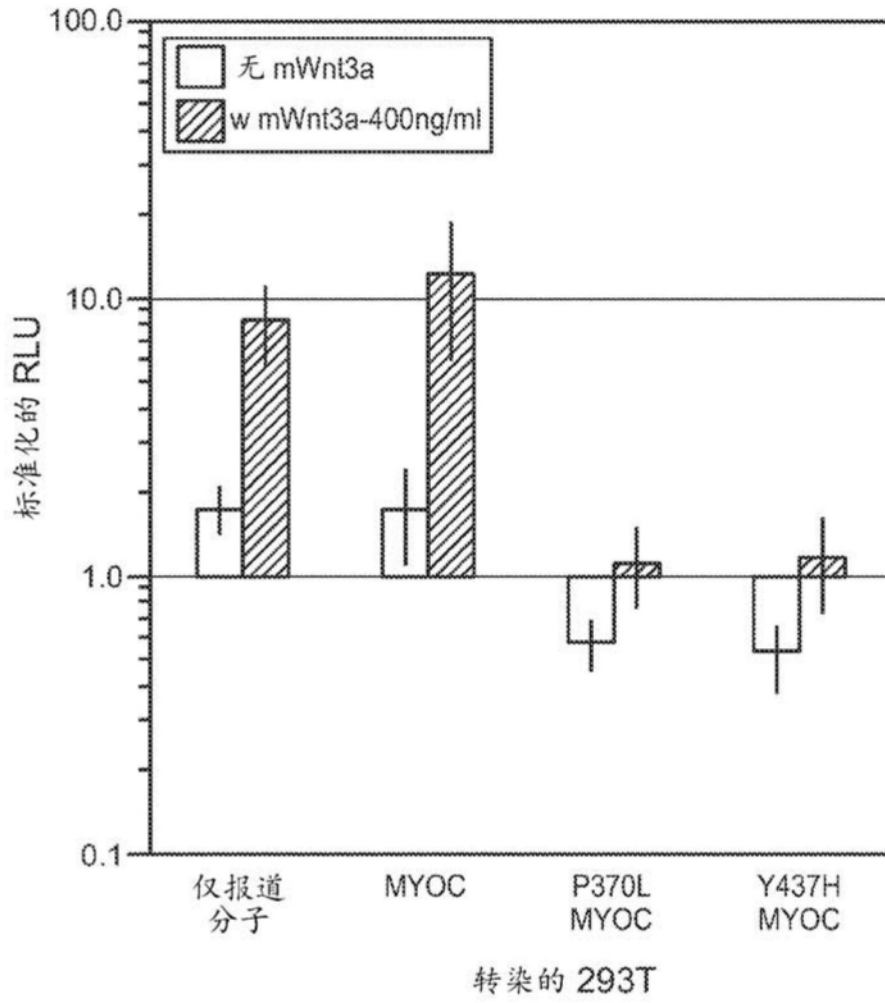


图3

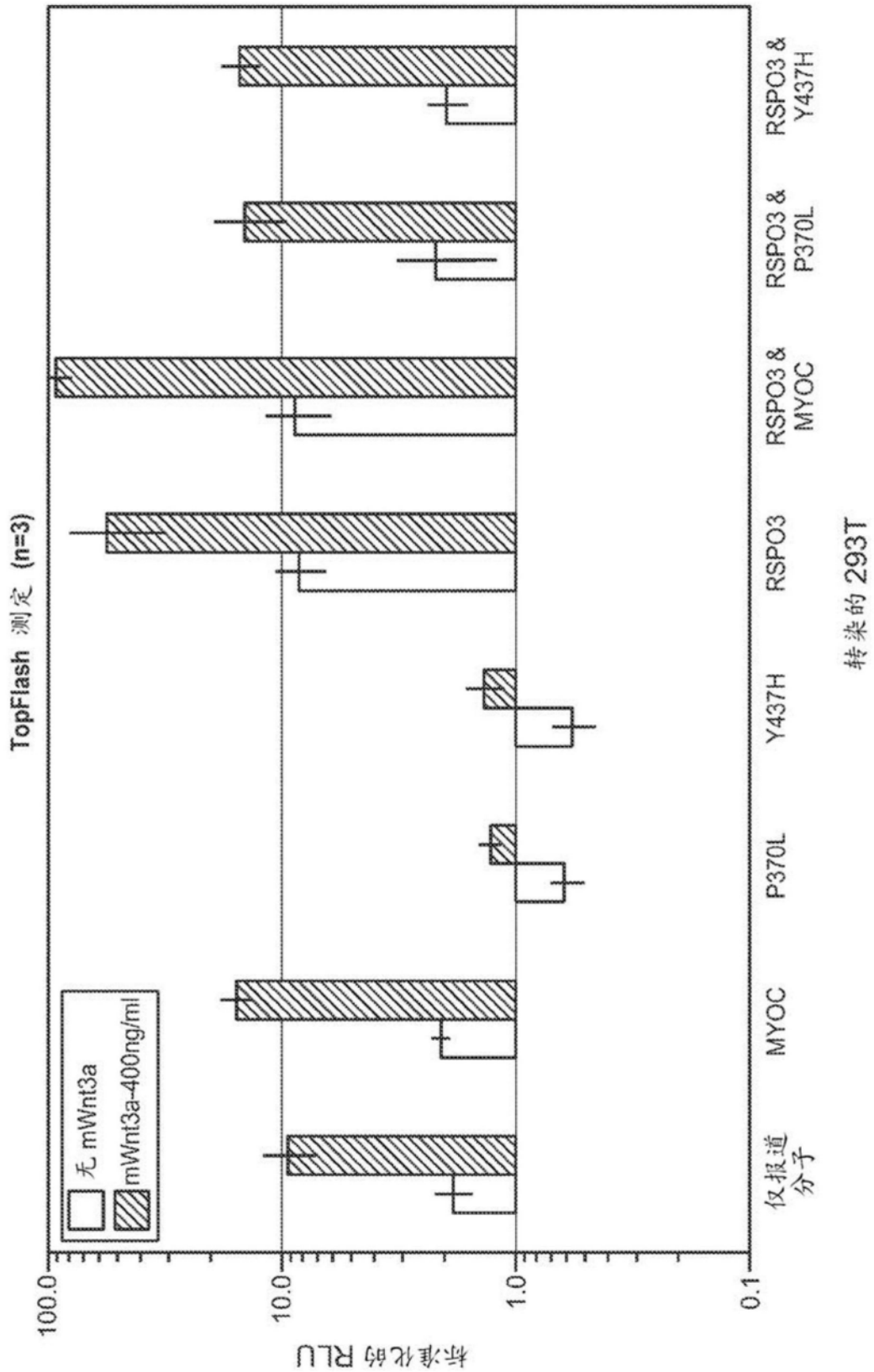


图4

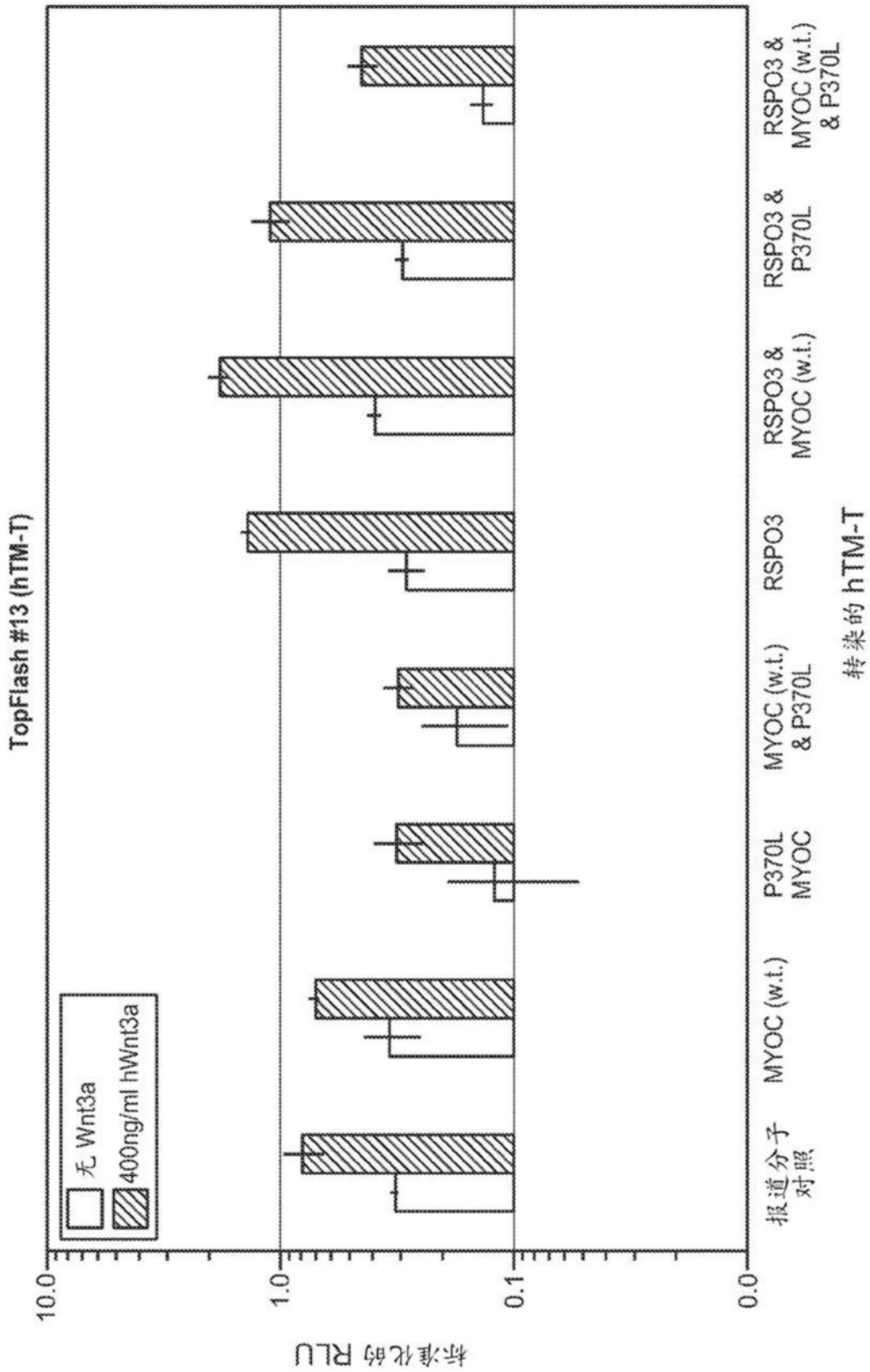


图5

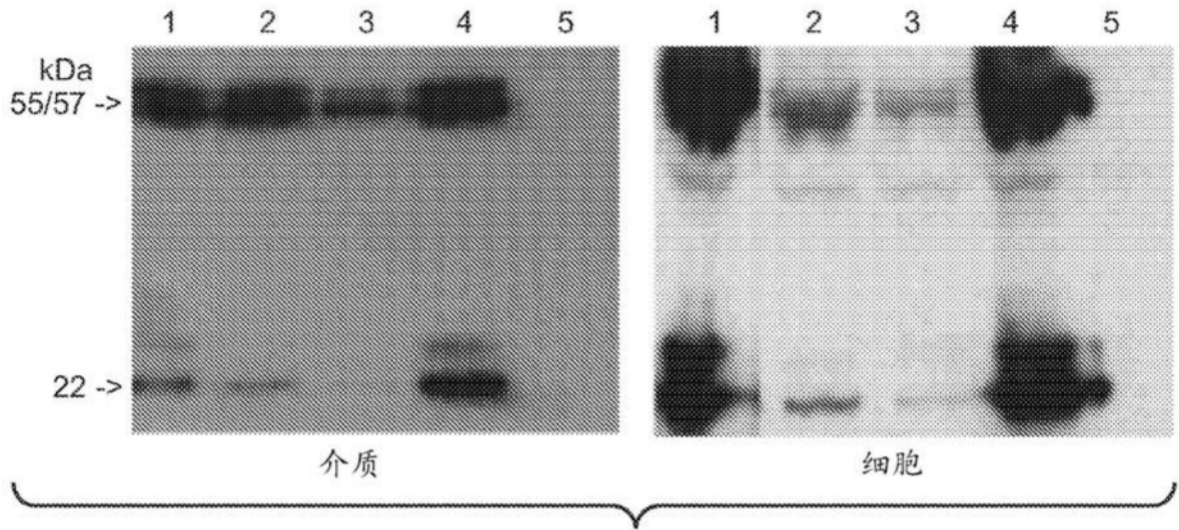


图6

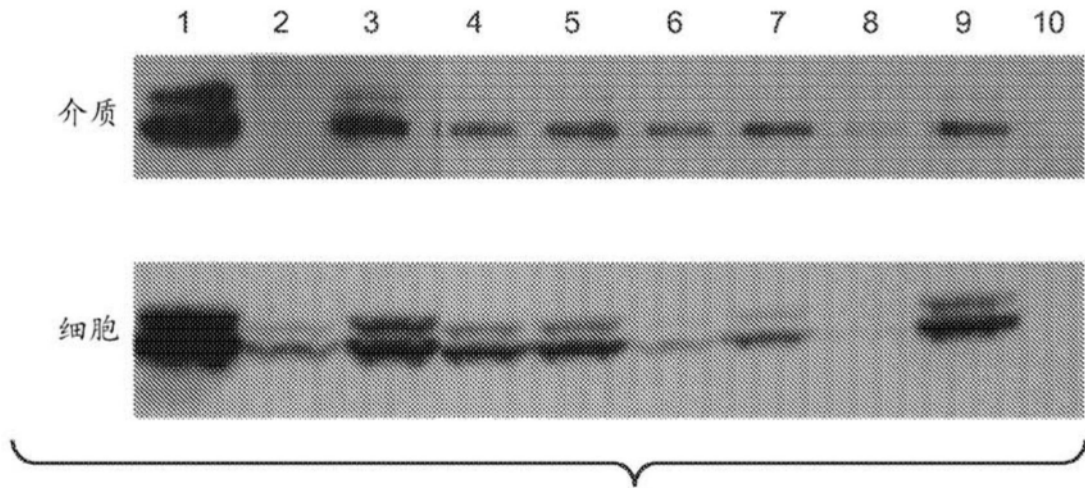


图7

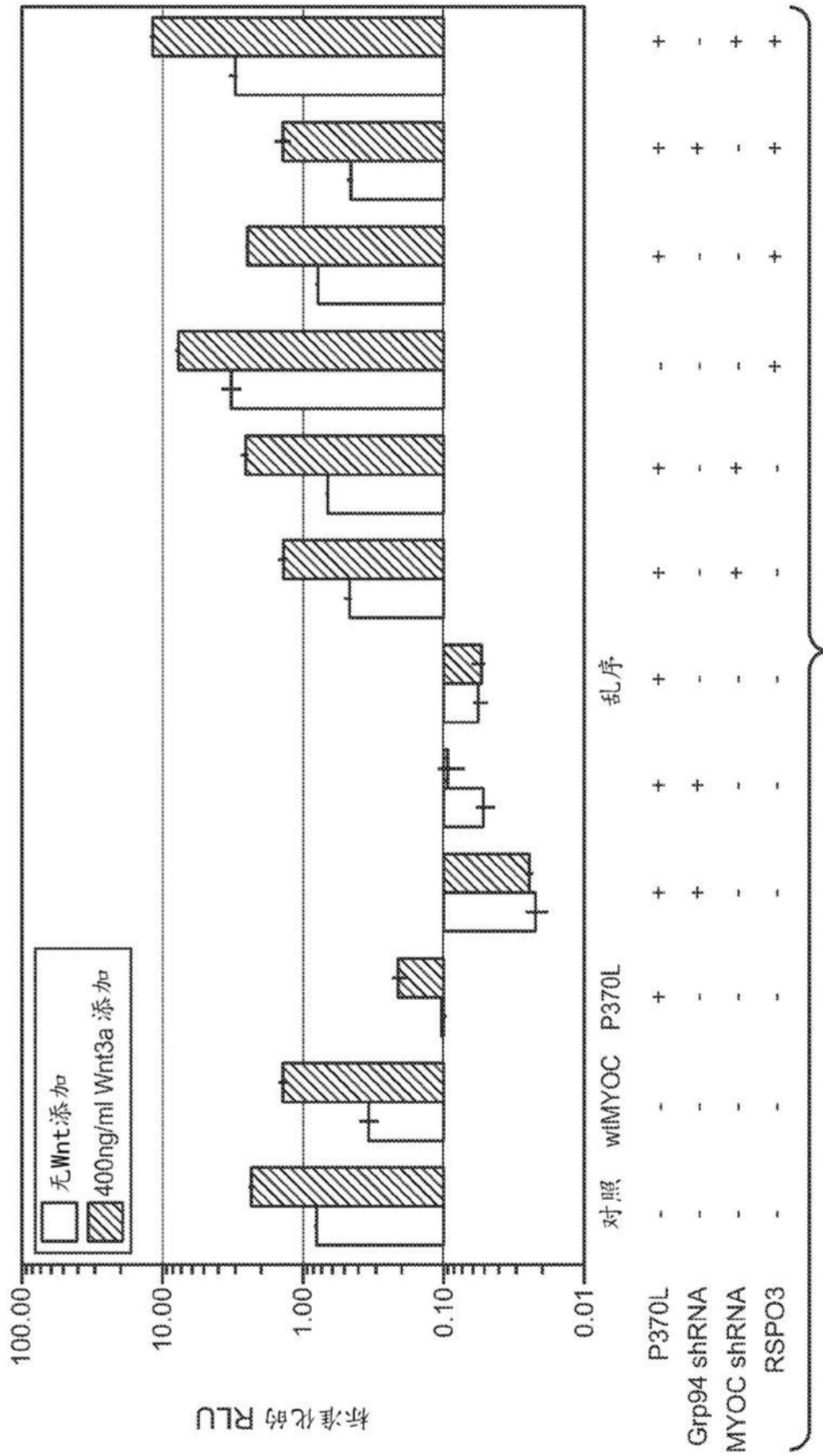


图8

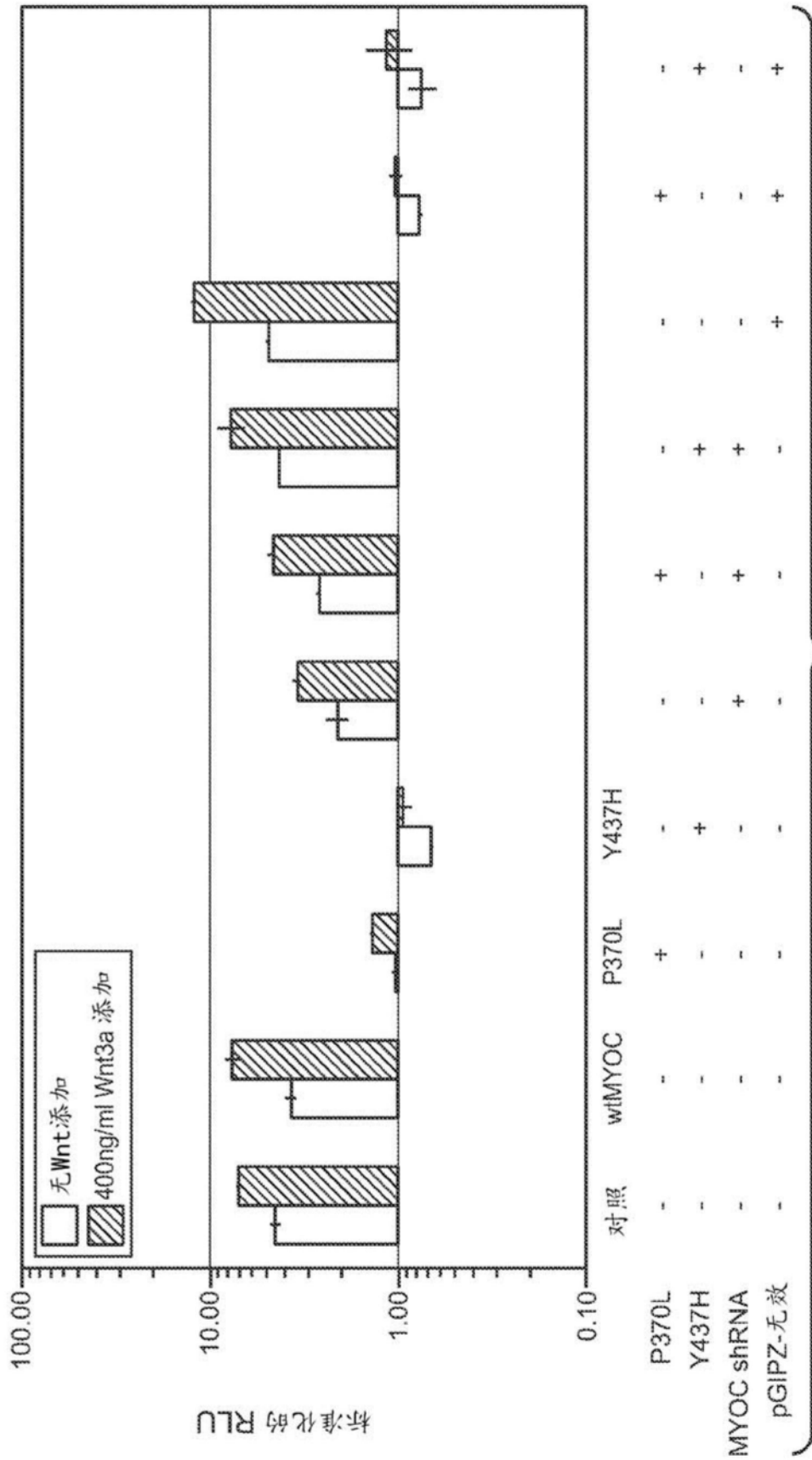


图9

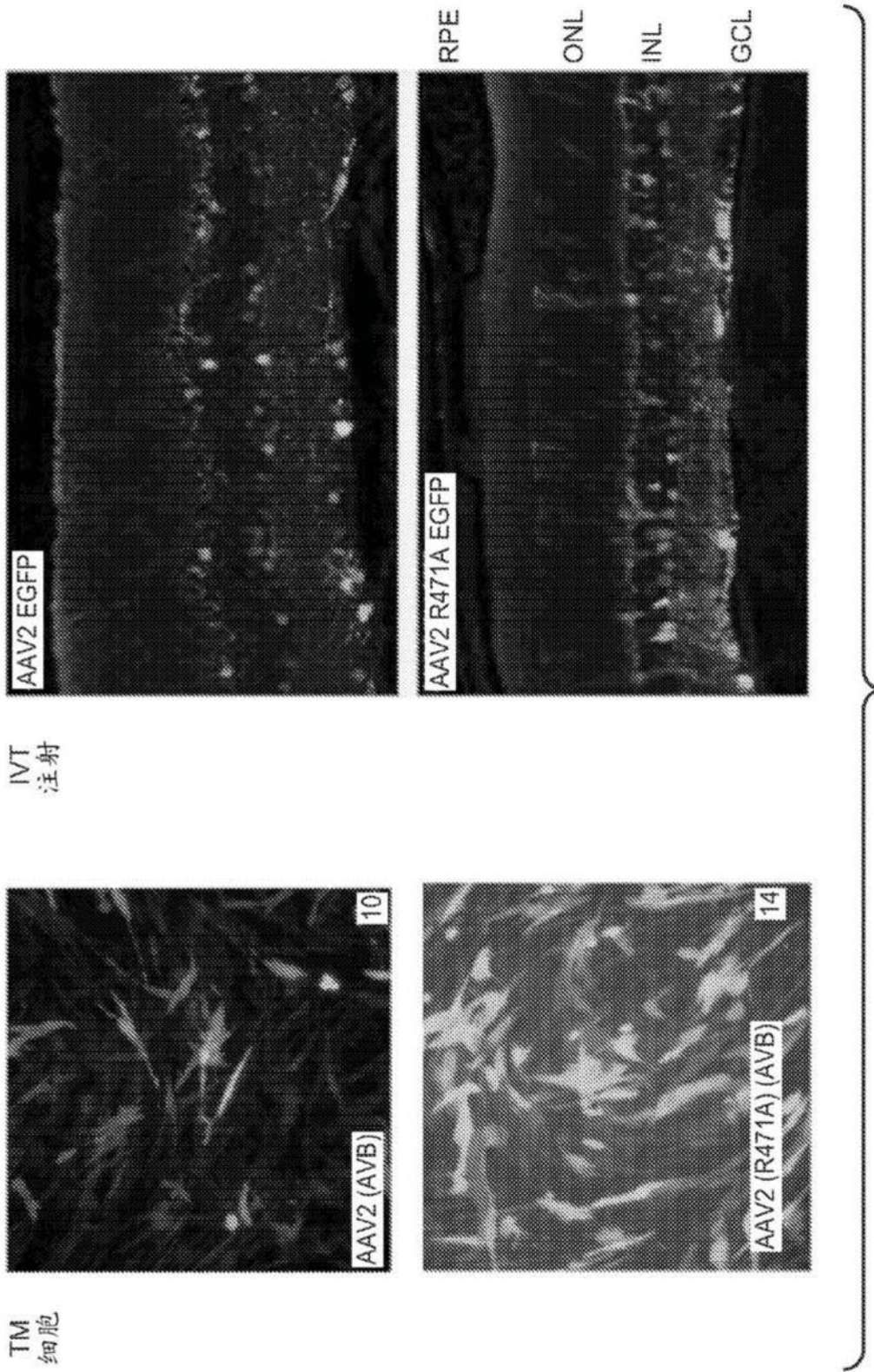


图10

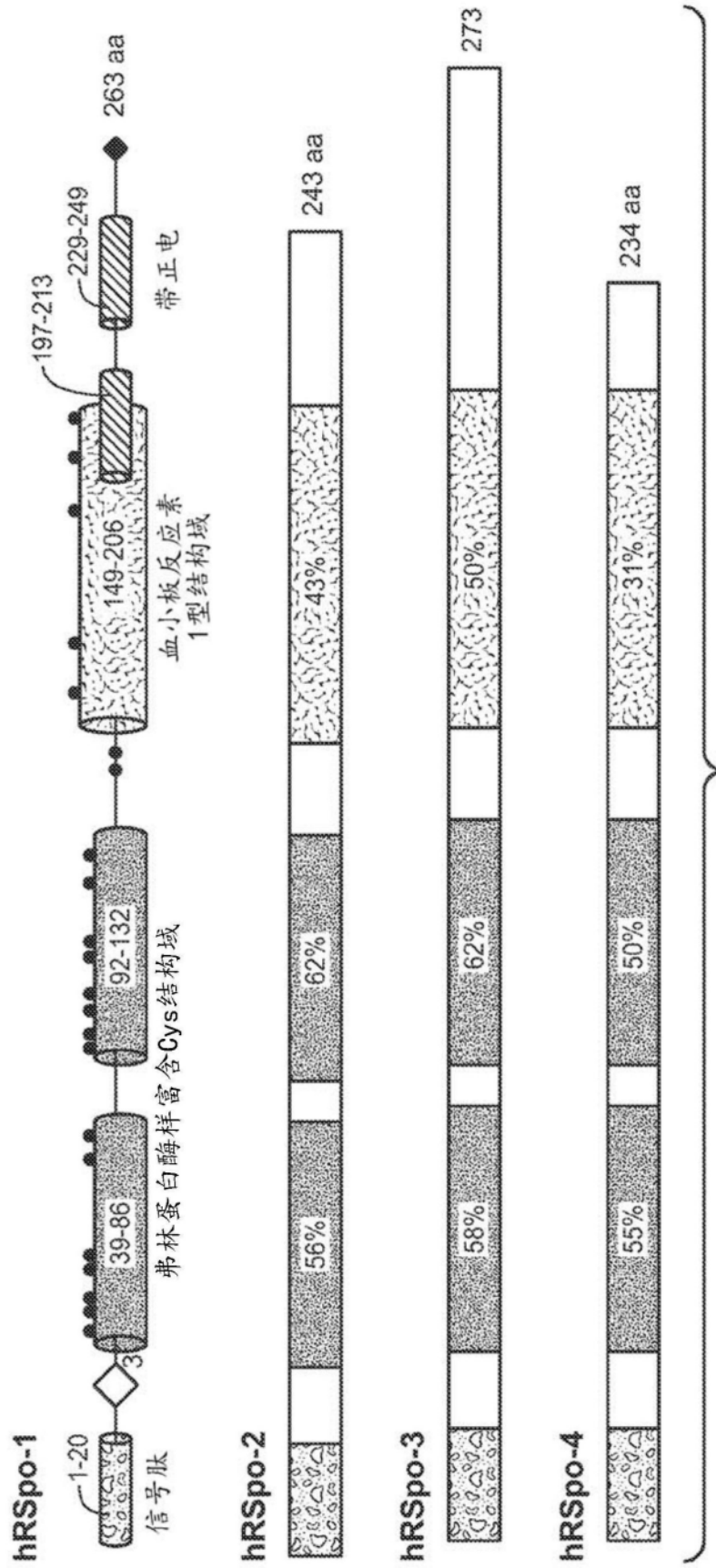


图11

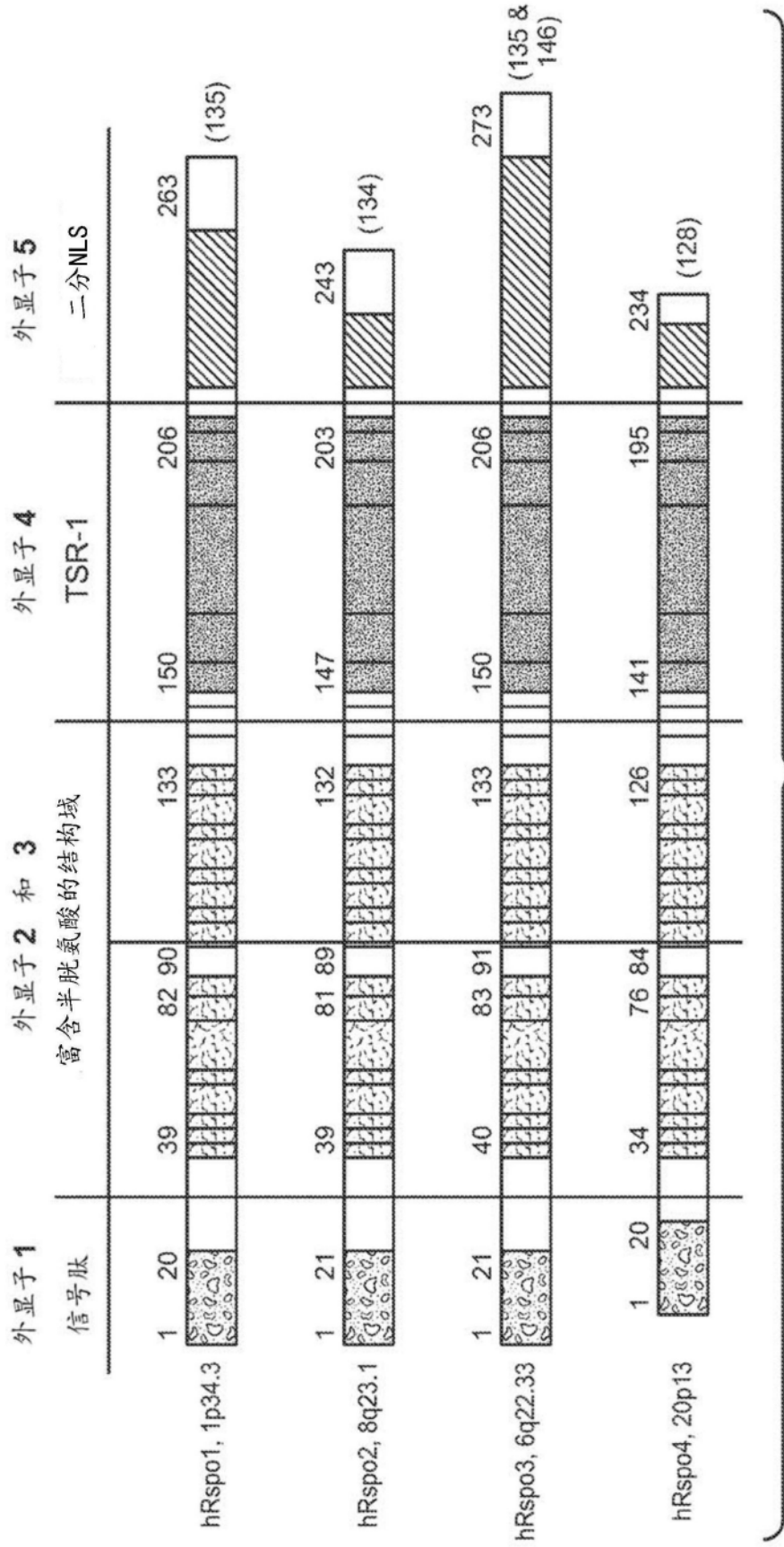


图12

信号

FU 1

MHLRLISWLEIILNFM EYIGSQNASRGRQRMRMH PNVSQGCQGGCATC
SDYNGCLSCCKPRLFFALERIGMKQIGVCLSSCPSGYYGTRYPDINKCTKCK FU 2
ADCDTCFNKNFCTKCKSGFYHLGKCLDNCPEGLEANNHTMECVSIVHC
EVSEWNPWSPCTKKGKTCGFKRGTETRVREIIQHPSAKGNLCPPTNETR TSP1
KCTVQRKKCQKGERGKGRERKRKPNKGESKEAIPDSKSLESSEIPEQ

RENKQQQKKRKVQDKQKSVSVSTVH*
201 272

图13A

信号

FU 1

MHLRLISWLFIIILNFMMEYIGSQNASRGRRQRRMHIPNVSQGCQGGCATC

SDYNGCLSCKPRLFFALERIGMKQIGVCLSSCPSGYYGTRYPDINKCTKCK FU 2

ADCDCFNKNFCTKCKSGFYHLGKCLDNCPEGLEANNHTMECVSIV

135 146

图13B

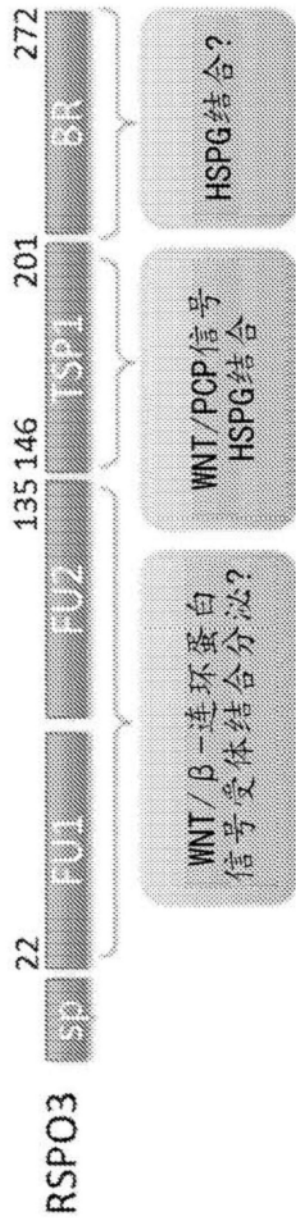


图13C

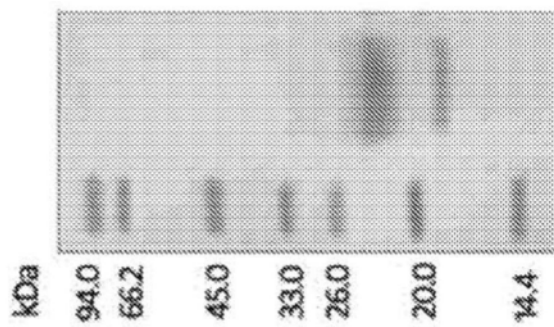


图13D

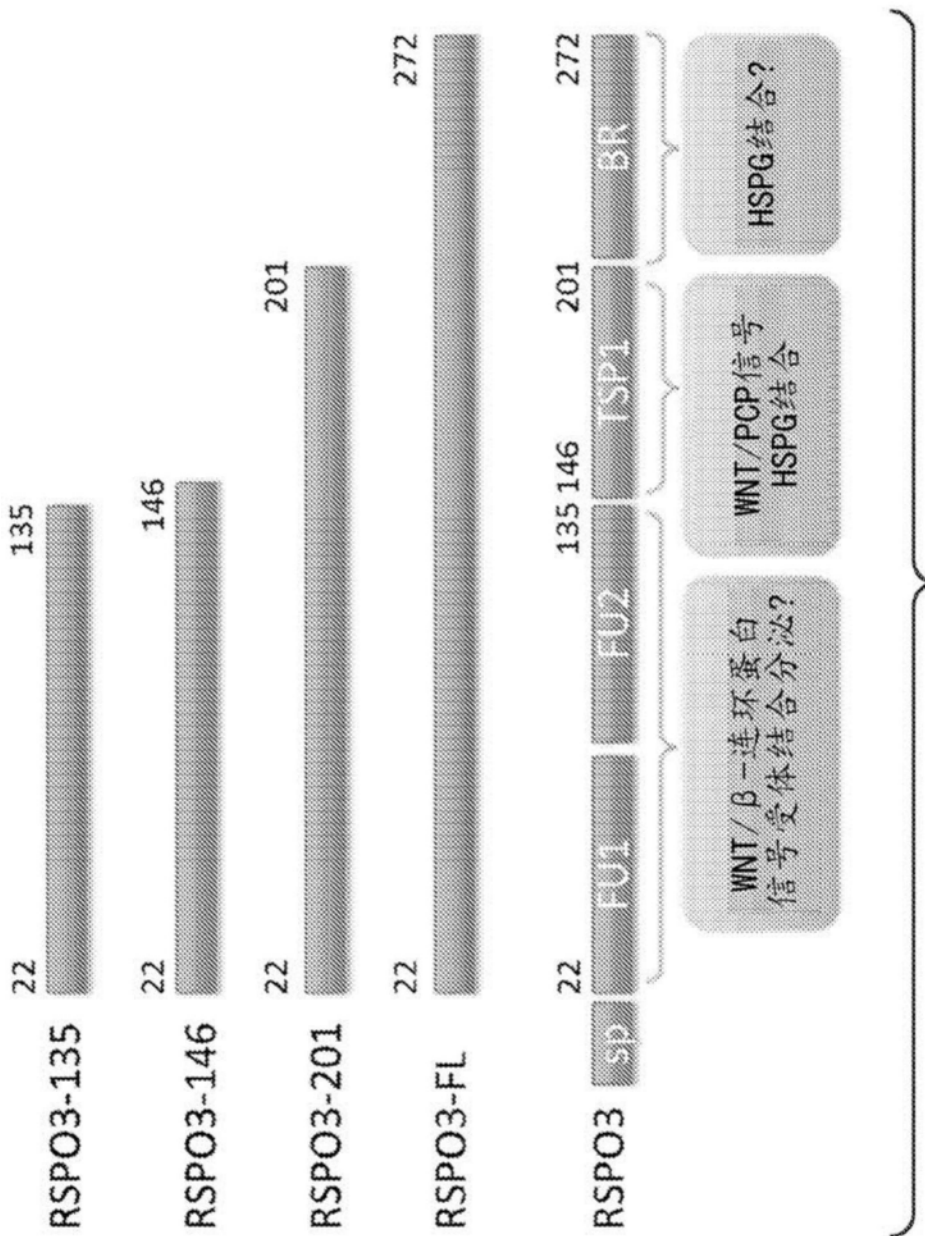


图14

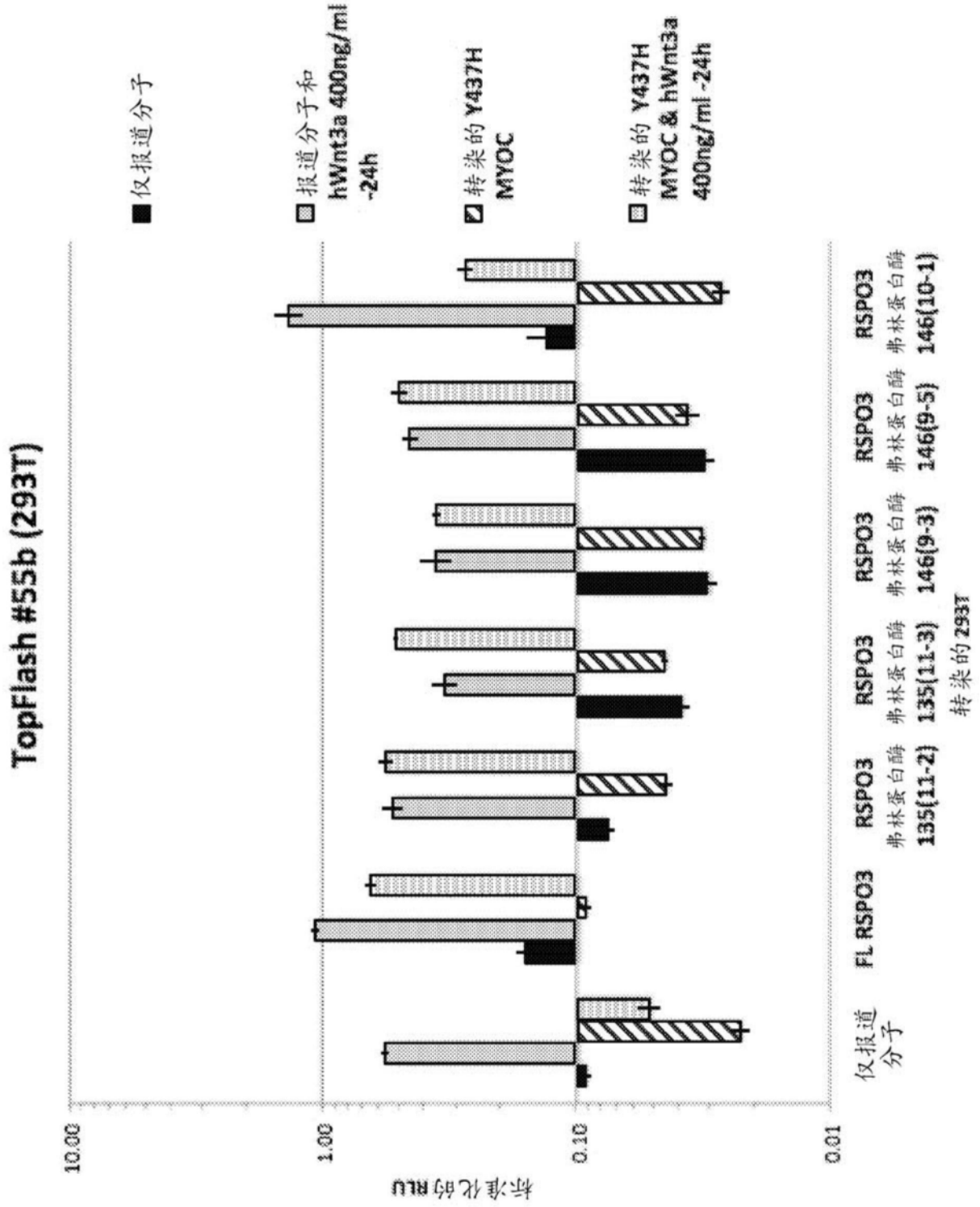


图15

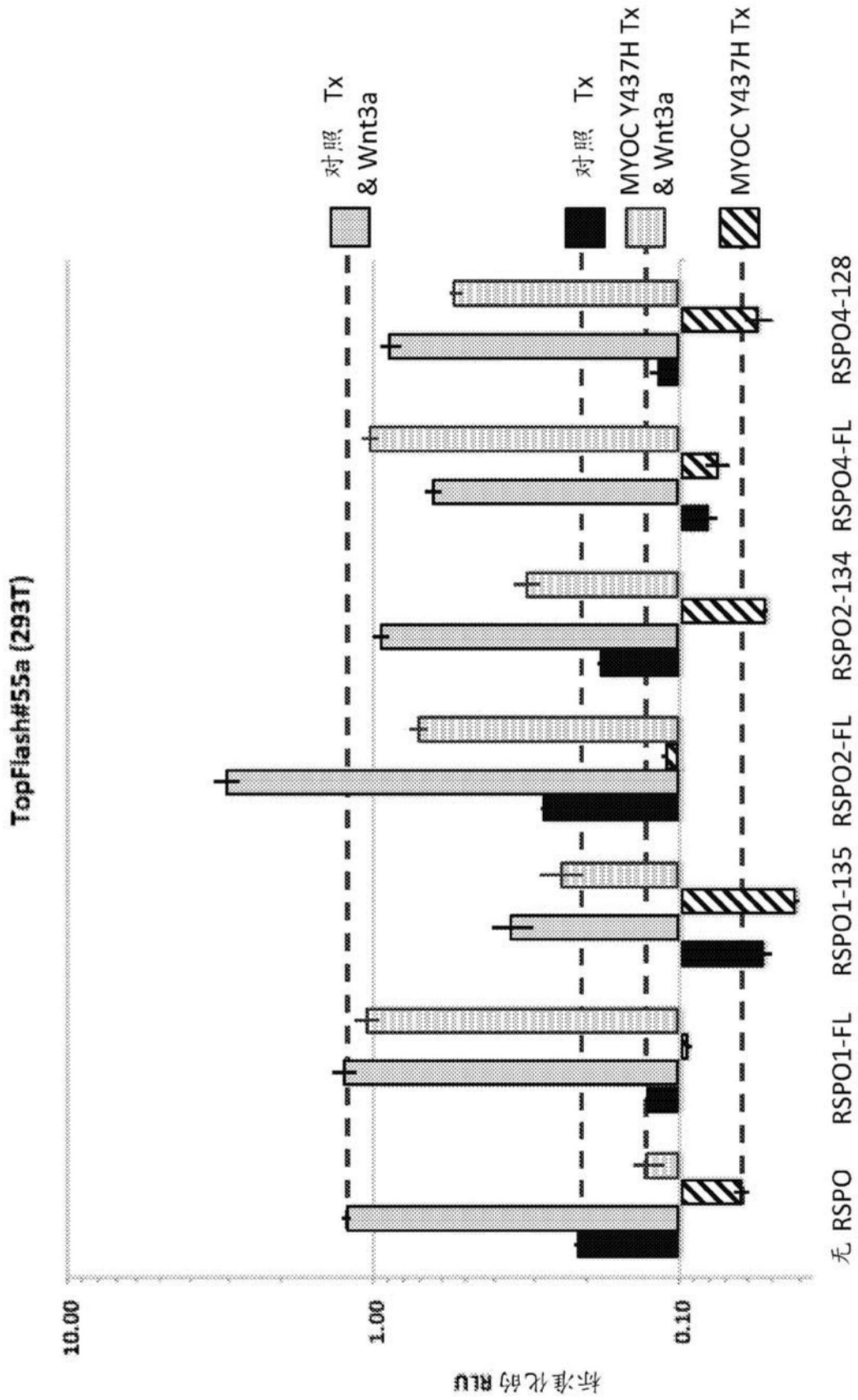


图16